

Université de Sherbrooke

**L'Endothéline-1 et ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales endocardiques
humaines : rôle dans la modulation du calcium intracellulaire**

Par

MAGDA DESCORBETH

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Université de Sherbrooke
Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

Septembre 2003



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-90596-9

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-90596-9

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

À mes chers parents, Vilna et Vénus,

À mes frères Widens et Mathieu

Pour leur amour inépuisable

leur encouragement

et leur support...

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
RÉSUMÉ.....	XVII
I. INTRODUCTION.....	1
1.1. L'endothélium endocardique.....	3
1.1.1. Morphologie des cellules endothéliales endocardiques.....	3
1.2. Interaction entre l'endothélium endocardique et le myocarde.....	7
1.3. Facteurs relâchés par les CEEs.....	10
1.3.1. Endothéline-1.....	13
1.3.2. Biosynthèse de l'endothéline.....	16
1.3.3. Les récepteurs de l'endothéline.....	19
1.3.4. Le récepteur ET _A	20
1.3.5. Le récepteur ET _B	21
1.3.6. Distribution intracellulaire des récepteurs à l'ET-1.....	25
1.3.7. Mécanisme de signalisation intracellulaire de l'ET-1.....	26
1.4. Le calcium.....	28
1.4.1. Les canaux calciques dépendants du voltage.....	29
1.5. L'ET-1 et l'endothélium endocardique	33
1.6. Résumé de la littérature et hypothèse et objectifs de travail.....	34

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	37
2.1. Isolation et culture des cellules endothéliales endocardiques du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.....	38
2.2. Mesure du calcium intracellulaire	39
2.2.1. Préparation des cellules.....	40
2.2.2. Microscopie à fluorescence.....	41
2.3. Microscopie confocale.....	45
2.3.1. Principe de base du système confocal.....	46
2.3.2. Balayage des cellules.....	46
2.4. Chargement des cellules avec la sonde calcique Fluo-3.....	49
2.5. Marquage du noyau.....	52
2.6. Marquage par immunofluorescence.....	54
2.6.1. Marquage de l'ET-1.....	54
2.6.2. Marquage des récepteurs ET _A et ET _B	55
2.6.3. Technique de l'immunofluorescence indirecte.....	55
2.6.4. Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale.....	56
2.7. Immunobuvardage western.....	57
2.7.1. Extraction des protéines.....	57
2.7.2. Technique de l'immunobuvardage western.....	58
2.7.3. Détection des antigènes.....	61
2.8. Statistiques.....	63
III. RÉSULTATS.....	64

3.1. Présence et distribution des récepteurs à l'ET-1 dans les cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines.....	65
3.1.1. Localisation et distribution du récepteur ET _A dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	65
3.1.2. Localisation et distribution du récepteur ET _B dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	71
3.1.3. Localisation et distribution de l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	82
3.2. Effet d'une concentration physiologique d'ET-1 sur le niveau basal du [Ca] _i des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	85
3.2.1. L'ET-1 extracellulaire augmente le niveau basal soutenu du [Ca] _i des CEEDs et des CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	88
3.3. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs ET _A (BQ123) et ET _B (BQ788), sur l'augmentation soutenue du [Ca] _i induite par l'ET-1 (10 ⁻¹⁰ M) dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	93
3.4. Effet de différentes concentrations d'ET-1 sur le niveau basal du [Ca] _c et du [Ca] _n des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	104
3.4.1. L'ET-1 extracellulaire augmente d'une façon dose-dépendante le niveau basal soutenu du [Ca] _c et du [Ca] _n des CEEDs et des CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	105

3.5. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs ET_A (BQ123) et ET_B (BQ788), sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 (10^{-10} M) dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	113
IV. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.....	126
4.1. Présence et distribution de l'ET-1 et des récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	129
4.2. Effet de l'ET-1 sur les niveaux de $[Ca]_i$ des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines et type de récepteur responsable de cet effet.....	138
4.3. Perspectives.....	144
V. REMERCIEMENTS.....	145
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	147

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Endothélium endocardique et la matrice extracellulaire.....	4
Figure 2	Effet de l'EE sur la contraction isométrique du muscle cardiaque.....	8
Figure 3	Interactions entre les cellules endothéliales endocardiques et les cardiomyocytes.....	11
Figure 4	Structure de l'endothéline-1, -2, et -3 humaines.....	14
Figure 5	Biosynthèse de l'ET-1.....	17
Figure 6	Représentation schématique du système de mesure de fluorescence.....	43
Figure 7	Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.....	47
Figure 8	Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale...	50
Figure 9	Marquage immunofluorescent du récepteur ET _A dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	67
Figure 10	Densité relative du récepteur ET _A au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	69
Figure 11	Présence du récepteur ET _A dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	72

Figure 12	Marquage immunofluorescent du récepteur ET _B dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	75
Figure 13	Densité relative du récepteur ET _B dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	77
Figure 14	Présence du récepteur ET _B dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	80
Figure 15	Marquage immunofluorescent de l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	83
Figure 16	Densité relative de l'ET-1 au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	86
Figure 17	Expérience représentative de l'effet d'une concentration physiologique d'ET-1 (10^{-10} M) sur les niveaux soutenus du [Ca] _i des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines étudié en utilisant le système d'imagerie en 2-D et la sonde ratiométrique le fura-2/AM.....	89
Figure 18	Effet d'une concentration physiologique d'ET-1 (10^{-10} M) sur le niveau soutenu du [Ca] _i des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	91

Figure 19	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _A , le BQ123, sur l'augmentation soutenue du niveau de [Ca] _i induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.....	95
Figure 20	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _A , le BQ123, sur l'augmentation soutenue du [Ca] _i induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.....	97
Figure 21	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _B , le BQ788, sur l'augmentation soutenue du niveau de [Ca] _i induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.....	100
Figure 22	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _B , le BQ788, sur l'augmentation soutenue du [Ca] _i induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.....	102
Figure 23	Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations d'ET-1 sur les niveaux soutenus du [Ca] _c et [Ca] _n des CEEDs et des CEEGs isolées du coeur foetal humain âgé de 20 semaines étudié en microscopie confocale.....	106

Figure 24	Effet de différentes concentrations d'ET-1 sur les niveaux soutenus du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	109
Figure 25	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A , le BQ123, sur l'augmentation soutenue du niveau de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	115
Figure 26	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A , le BQ123, sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	117
Figure 27	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B , le BQ788, sur l'augmentation soutenue du niveau de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	120
Figure 28	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B , le BQ788, sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs des endothélines.....	22
Tableau 2	Composition des gels utilisés en immunobuvardage western.....	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[Ca] _c	Concentration de calcium libre cytosolique
[Ca] _i	Concentration de calcium libre intracellulaire
[Ca] _n	Concentration de calcium libre nucléaire
°C	Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
ACE	Enzyme de conversion de l'Angiotensine
ADH	Vasopressine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
BK	Bradykinine
B ₁	Récepteur à la bradykinine de type 1
B ₂	Récepteur à la bradykinine de type 2
bFGF	Facteur de base pour la croissance des fibroblastes
Ca ²⁺	Calcium

CaM	Calmoduline
CAV-1	Cavéoline-1
CEE	Cellules endothéliales endocardiques
CEED	Cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule droit
CEEG	Cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule gauche
CEV	Cellules endothéliales vasculaires
CMLV	Cellules du muscle lisse vasculaire
COX-1	Cyclooxygénase de type 1
COX-2	Cyclooxygénase de type 2
CTX	Toxine de choléra
Cx 37	Connexine de type 37
Cx 40	Connexine de type 40
Cx 43	Connexine de type 43
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EC ₅₀	Concentration produisant 50% de la réponse maximale
EE	Endothélium endocardique
EGF-R	Récepteur au facteur de croissance épidermique
EP ₃	Récepteur à la prostaglandine E de type 3
EP ₄	Récepteur à la prostaglandine E de type 4
ERK	Kinases régulées par signaux extracellulaires

E.S.M	Erreur Standard de la Moyenne
ET-1	Endothéline-1
ET-2	Endothéline-2
ET-3	Endothéline-3
ET _A	Récepteur à l'endothéline de type A
ET _B	Récepteur à l'endothéline de type B
ET _C	Récepteur à l'endothéline de type C
EV	Endothélium vasculaire
FBS	Sérum de bovin fœtal
FITC	Fluorescéine Isothiocyanate
Flk-1	Kinase de foie fœtal de type 1
IgG	Immunoglobuline G
IP ₃	Inositol triphosphate
IP ₄	Inositol 4 phosphates
Lys	Lysine
MAP	Protéine activée par les mitogènes
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mV	Millivolt
n	Nombre de cellules

NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NGS	Sérum normal de chèvre
NRS	Sérum normal de lapin
nM	Nanomolaire
NO	Monoxyde d'azote
p	Probabilité
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PBS	Tampon phosphate salin
PL ₄ K	Phosphatidylinositol 4-kinase
PG	Prostaglandine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLD	Phospholipase D
PMT	Multiplicateur de photon
PP-2A	Sérine/thréonine phosphatase 2A
PS	Picosiemens
PTP	Phosphotyrosine phosphatase
PTX	Toxine de pertussis
RAS	Système rénine-angiotensine
AT ₁	Récepteur à l'angiotensine II de type AT ₁

AT ₂	Récepteur à l'angiotensine II de type AT ₂
rpm	Révolution par minute
SDS	Sulfate de sodium dodécyl
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant
S-MEM	Milieu Essentiel Minimal de Suspension
Tie-2	Kinase de la tunique interne des cellules endothéliales
TNF α	Facteur de nécrose tumoral de type α
VEGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
vWF	Facteur de Von Willebrand
Y ₁	Récepteur au neuropeptide Y de type 1

**L'Endothéline-1 et ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales
endocardiques humaines: rôle dans la modulation du calcium intracellulaire**

Par

Magda Descorbeth

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade
de Maître ès Sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

RÉSUMÉ

L'ET-1, un peptide de 21 acides aminés, est le vasoconstricteur le plus puissant isolé jusqu'à date. L'ET-1 se retrouve dans plusieurs tissus et joue divers rôles. Chez l'humain, ces effets sont relayés via deux types de récepteurs : les récepteurs ET_A et ET_B. Au niveau du système cardiovasculaire, la majorité des travaux effectués ont étudié l'effet de l'ET-1 sur le muscle cardiaque, le muscle lisse vasculaire et l'endothélium vasculaire. Cependant, aucune étude a démontré l'effet de l'ET-1 sur l'endothélium endocardique (EE) qui tapisse les cavités cardiaques et qui joue un rôle important dans la régulation de la fonction cardiaque. Dans la première partie de cette étude, nous avons étudié l'expression et la distribution de l'ET-1 et de ses récepteurs ET_A et ET_B au niveau des cellules endothéliales endocardiques isolées des ventricules droit (CEEDs) et gauche (CEEGs) du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Nos résultats ont démontré que le récepteur ET_A est présent au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et au niveau du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEDs et des CEEGs, tandis que le récepteur ET_B se retrouve plus particulièrement au niveau du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des deux types cellulaires. Nous avons aussi observé que la densité des récepteurs ET_A est similaire au niveau des CEEDs et des CEEGs tandis que celle des récepteurs ET_B est plus élevée au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs. En ce qui concerne l'ET-1, on le retrouve au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et plus particulièrement au niveau du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEDs et des CEEGs. De plus, nous avons observé que la densité de l'ET-1 est

plus élevée au niveau des CEEDs par rapport aux CEEGs. Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons étudié l'effet de l'ET-1 sur le niveau basal soutenu du calcium intracellulaire ($[Ca]_i$) au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Nos résultats montrent que l'ET-1 induit une augmentation soutenue de la concentration du $[Ca]_i$ à la fois dans les CEEDs et les CEEGs. Dans la troisième partie de cette étude, nous avons étudié l'effet de l'ET-1 sur le niveau basal soutenu du calcium cytosolique ($[Ca]_c$) et du calcium nucléaire ($[Ca]_n$) au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Nos résultats montrent que l'ET-1 induit une augmentation dose-dépendante de la concentration du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ à la fois dans les CEEDs et les CEEGs. Cependant, il semble que les CEEGs sont plus sensibles à l'ET-1 par rapport aux CEEDs; les EC_{50} étant de l'ordre de 10^{-11} M et 10^{-10} M, respectivement. De plus, nos résultats démontrent qu'au niveau des CEEGs, l'ET-1 induit une augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ via l'activation des récepteurs ET_A et ET_B tandis qu'au niveau des CEEDs, cet effet est principalement dû à l'activation des récepteurs ET_A sans exclure la participation du récepteur ET_B .

Mots clés : Endothéline-1, Récepteurs ET_A et ET_B , Cellules endothéliales endocardiques, Calcium, Noyau.

I. INTRODUCTION

Suite à la découverte de FURCHGOTT et ZAWADSKI en 1980 du rôle très important de l'endothélium vasculaire dans la régulation du tonus vasculaire, l'endothélium a émergé comme étant une structure fonctionnelle essentielle du système cardiovasculaire (BRUTSAERT, 2003). L'endothélium contribue à l'homéostasie cardiovasculaire, non seulement en régularisant la perméabilité vasculaire, mais aussi en ajustant la dimension des vaisseaux sanguins aux demandes hormonales et hémodynamiques et en maintenant la fluidité sanguine (BRUTSAERT, 2003). Les cellules endothéliales assurent leurs fonctions par l'expression, l'activation et la relâche de facteurs vasoactifs (vasoconstricteurs, vasodilatateurs) ainsi que par plusieurs autres molécules bioactives (facteurs pro et anticoagulants, facteurs de croissances, facteurs pro- et -anti thrombotiques, facteurs angiogéniques, etc...) (BRUTSAERT, 2003). Pour cette raison, l'endothélium interagit, d'une façon complexe, avec son environnement immédiat tout en assurant un équilibre bien ajusté avec ce dernier (pour plus de détails voir BRUTSAERT, 2003).

Des études menées par BRUTSAERT et ses collaborateurs ont démontré que la performance contractile du muscle cardiaque isolé pouvait être modifiée par la présence de cellules endothéliales endocardiques (CEEs) intactes, suggérant ainsi que tout comme les cellules endothéliales vasculaires, les CEEs au niveau du cœur jouent un rôle dans la régulation et le maintien de la fonction cardiaque (BRUTSAERT, 1989; BRUTSAERT *et al.*, 1987; 1988).

1.1. L'endothélium endocardique:

L'endothélium endocardique (EE) est une monocouche de cellules qui tapisse les cavités du cœur, les trabécules et les muscles papillaires (RHODIN, 1974). Chez l'humain, cette monocouche de cellules a une épaisseur de 0.5 μm (RHODIN, 1974). Elle est séparée des cardiomyocytes sous-adjacents par une matrice extracellulaire qui est constituée d'une lame réticulée, d'une lame basale et d'une couche fibroblastiques (figure1). La proximité de l'EE des cardiomyocytes sous-adjacents permet à ces deux types cellulaires de communiquer directement l'une avec l'autre (pour plus de détails voir BRUTSAERT, 2003).

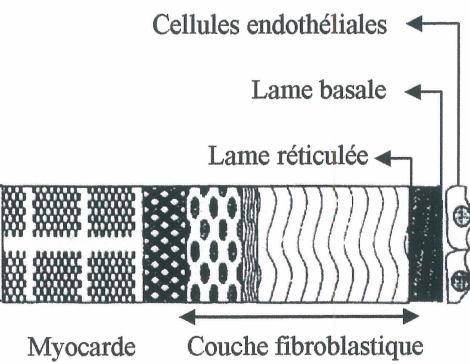
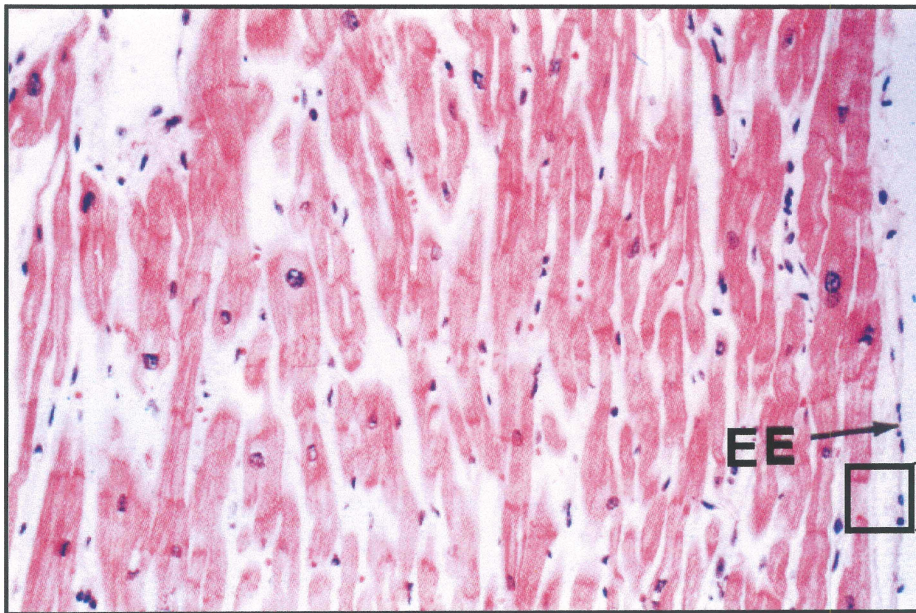
1.1.1. Morphologie des cellules endothéliales endocardiques:

Les cellules endothéliales endocardiques (CEEs) forment une couche de cellules polygonales très serrées (YAMAUCHI, 1980). Les CEEs sont plus larges que la plupart des cellules endothéliales présents dans différentes régions du système circulatoire (BRUTSAERT, 2003). La surface luminale des CEEs possède des microvillosités et des invaginations membranaires conférant ainsi à l'EE une large surface de contact avec le sang circulant, facilitant l'échange entre le sang et les CEEs (BRUTSAERT *et al.*, 1996) et donnant aux CEEs le rôle important de capteur (BRUTSAERT, 1989). Les fentes intracellulaires entre les CEEs sont profondes et tortueuses et contiennent une ou deux jonctions serrées (BRUTSAERT, 2003). Le

Figure 1 Endothélium endocardique et matrice extracellulaire

L'endothélium endocardique (EE) est la couche la plus interne du cœur constituée d'une monocouche de cellules endothéliales. Entre les CEEs et les cardiomyocytes sous-jacents (couleur rose), il y a une matrice extracellulaire constituée d'une lame basale et réticulée contenant des fibres de collagènes tandis que la couche fibroblastique contient des vaisseaux sanguins et un plexus nerveux.

Modifié de RHODIN, 1974.



transport entre les cellules endothéliales peut être relayé par une diffusion à travers les fentes intercellulaires, ou à travers des contacts d'adhésion focaux (LUM et MALIK, 1996). La perméabilité entre les cellules endothéliales au niveau des fentes intercellulaires est contrôlée majoritairement par la structure complexe des fentes qui sont recouvertes d'un glycocalyx chargé négativement, par la présence de une ou de deux jonctions serrées et par la présence de zonula adherens bien organisées (ANDRIES et BRUTSAERT, 1994).

Il a été également démontré que les CEEs possèdent un grand nombre de jonctions de type gap (ANVERSA *et al.*, 1975 : ANDRIES et BRUTSAERT, 1994) étant formées de plusieurs types de connexines (Cx43, Cx40 et Cx37) (BRUTSAERT *et al.*, 1998) suggérant qu'il y a un couplage électrochimique intime entre ces cellules (BRUTSAERT et ANDRIES., 1992). Ce type de communication permet une propagation électrochimique rapide entre les cellules de l'EE suite à l'activation, même d'une seule cellule (BÉNY, 1999).

Il a été aussi démontré que les CEEs contiennent des corps de Weibel-Palade (ANDRIES et BRUTSAERT, 1990). Ces structures contiennent le facteur de Von Willebrand (vWF) qui joue un rôle important dans la coagulation sanguine, l'adhérence des plaquettes à la matrice extracellulaire ainsi dans l'agrégation plaquettaire (SPORN *et al.*, 1989). Les CEEs possèdent également un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi bien développés (ANDRIES et BRUTSAERT, 1990; BRUTSAERT et ANDRIES, 1992; ANDRIES et BRUTSAERT, 1994; JACQUES *et al.*, 2000) ainsi

qu'un large noyau entouré d'un grand nombre de mitochondries (JACQUES *et al.*, 2000), suggérant que ces cellules sont métaboliquement très actives. Les CEEs sont soumises à des stress physico-mécaniques qui peuvent avoir des conséquences sur leurs structures et leurs fonctions (BRUTSAERT *et al.*, 1996). Les filaments d'actines forment une bande d'actine périphérique : cette bande est associée à la ceinture d'adhérence (zonula adherens) et participe à la régulation de la perméabilité paracellulaire (ROTROSEN et GALLIN, 1986; WYSOLMERSKI et LAGUNOFF, 1988). Les filaments d'actines sont également organisés comme des fibres de stress qui, en augmentant l'adhésion cellulaire, jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium (GOTLIEB *et al.*, 1991).

1.2. Interaction entre l'endothélium endocardique et le myocarde

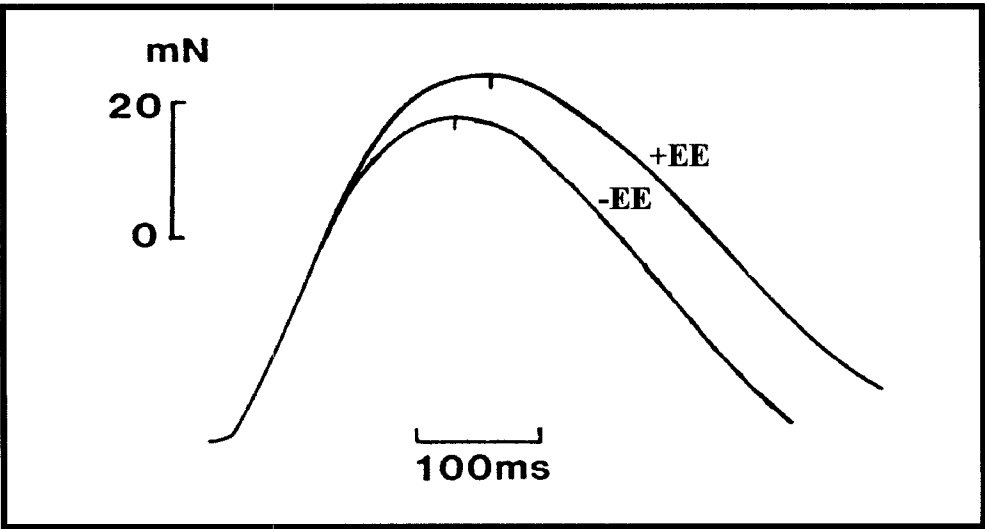
En 1988, BRUTSAERT et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer l'influence des CEEs sur la performance contractile des myocytes. Ils ont démontré qu'un muscle papillaire isolé, dénudé de l'EE, induisait une relaxation précoce et une diminution de la force de contraction du muscle cardiaque (figure 2) (BRUTSAERT *et al.*, 1988). Par contre, aucun changement significatif n'a été observé au niveau de la vitesse de contraction du muscle.

Les mécanismes de transduction du signal des CEEs aux cardiomyocytes sous-jacents ne sont pas encore bien connus. Il a été proposé que l'EE agit comme une barrière

Figure 2 Effet de l'EE sur la contraction isométrique du muscle cardiaque

Cette figure montre la force d'une contraction isométrique en fonction du temps, en présence (+EE) et en absence (-EE) de l'endothélium endocardique au niveau du muscle papillaire du chat. Une dénudation de l'EE au niveau du muscle papillaire induit une relaxation précoce et une diminution de la force contractile, sans aucun changement significatif dans la première phase de la contraction.

Modifié de BRUTSAERT et al., 1988.



physico-chimique contrôlant la composition ionique du milieu interstitiel des cellules cardiaques via des canaux ioniques, échangeurs et pompes présents dans la membrane plasmique de ces cellules (figure 3) (BRUTSAERT et ANDRIES, 1992). Il a été également démontré que l'EE par des stimulations physiques et humorales secrète des médiateurs cardioactifs comme par exemple l'ET-1, le NO et le PGI₂ qui peuvent affecter la performance contractile et le rythme cardiaque (BRUTSAERT et ANDRIES, 1992). Il est à noter que l'effet du NO, des prostacyclines, de l'ET-1 et de l'Ang II et leur rôles possibles dans l'hypertrophie au niveau du cœur adulte a aussi été bien étudié (pour plus de détails voir BRUTSAERT, 2003). De plus, il a été aussi rapporté que les CEEs possèdent le récepteur FIK-1 du VEGF (LIAO *et al.*, 1997; SHALABY *et al.*, 1995) et le récepteur Tie-2 de l'angiopoietine-I (PURI *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 1995; SURI *et al.*, 1996); le VEGF et l'angiopoietine-I étant impliqué dans la différenciation et la prolifération des CEEs (FONG *et al.*, 1995; PURI *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 1995; SURI *et al.*, 1996) et dans le développement cardiaque et le processus de trabéculatation du myocarde (MIQUEROL *et al.*, 1999; SUGISHITA *et al.*, 2000).

1.3. Facteurs relâchés par les CEEs

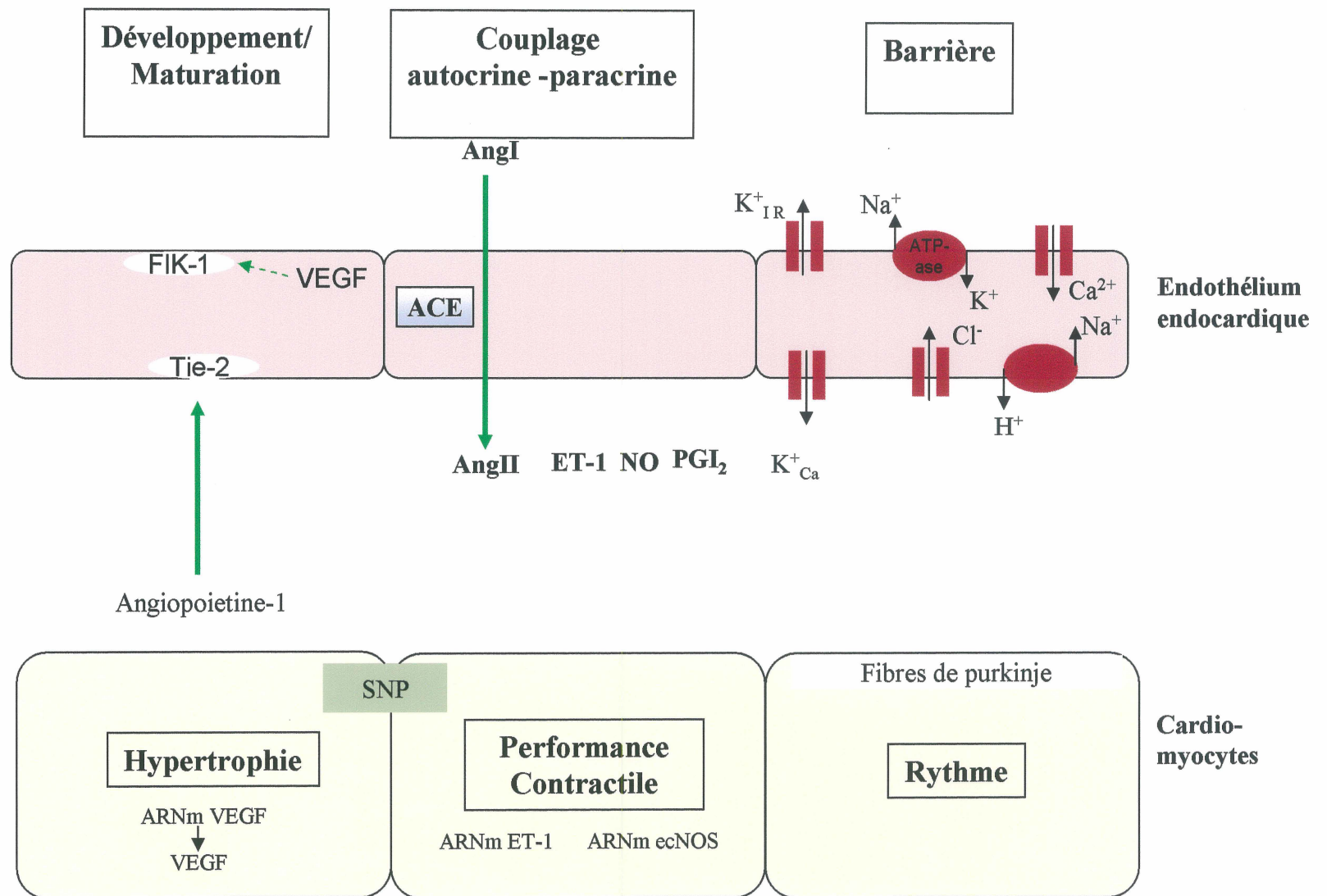
Les CEEs expriment et relâchent une variété d'agents auto et paracrines qui influencent directement le métabolisme, l'hypertrophie, la performance contractile et le rythme cardiaque (BRUTSAERT, 2003). Dans le cœur normal adulte, les CEEs

Figure 3 Interactions entre les cellules endothéliales endocardiques et les cardiomyocytes.

L'endothélium endocardique (EE) interagit directement avec les cardiomyocytes sous-jacents et influence la performance contractile, le rythme cardiaque ainsi que le développement/maturation du cœur et des CEEs elles-même. Les CEEs agissent sur les cardiomyocytes par la libération de médiateurs cardioactifs tels l'ET-1, le NO et le PGI₂, en agissant comme barrière sélective entre le sang et le cœur et participe au processus de maturation des CEEs elles-mêmes et du myocarde par l'action de divers facteurs de croissance comme le VEGF et l'Angiopoietine-1.

ET-1, endothéline-1; NO, oxyde nitrique; PGI₂, prostacycline; AI et AII, angiotensine I et II; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire; FIK-1, récepteur au VEGF; Tie-2, récepteur à l'angiopoietine-1; K⁺, potassium; Na⁺, sodium; Ca²⁺, calcium; Cl⁻, chlore; H⁺, hydrogène; VEGF ARNm, ARNm du VEGF; ET ARNm, ARNm de l'endothéline; ecNOS ARNm, ARNm de la monoxyde d'azote synthase endothéliale; SNP, plexus nerveux sous-endothélial.

Modifié de BRUTSAERT et al., 2003



relâchent le NO, l'ET-1, les PGI₂ ainsi que l'Ang II et les adényl-purines et possèdent la NOS constitutive (eNOS ou NOSIII), l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE) et des activités kinases qui déterminent les niveaux locaux de l'angiotensine II et de la bradykinine (BK) (SCHULZ *et al.*, 1991; YAMADA *et al.*, 1991; LINDPAINTNER et GRANTEN, 1991; PAUL *et al.*, 1992; MEBAZAA *et al.*, 1993; 1993a; SHAH *et al.*, 1996; BRUTSAERT *et al.*, 2003). Dû au fait que le sujet de ce mémoire de maîtrise se concentre sur l'endothéline-1 et ses récepteurs, nous allons donc nous limiter, dans les sections suivantes, à ce qui est connu sur l'endothéline et ses récepteurs au niveau des CEEs.

1.3.1. Endothéline-1

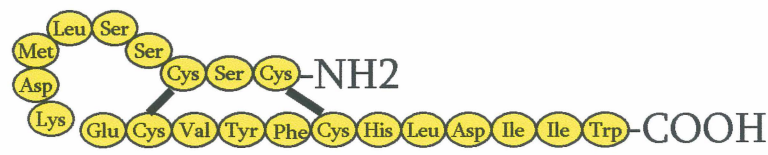
En 1988, Yanagisawa et ses collaborateurs ont isolé, à partir du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc en culture, l'endothéline (ET) un des vasoconstricteurs les plus puissants isolé jusqu'à date (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Ce peptide est formé de 21 acides aminés et possède quatre résidus de cystéines formant deux ponts disulfures intramoléculaires (figure 4) (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Par la suite, des études menées par INOUE, en 1989, ont démontré que l'ET était le prototype d'une nouvelle famille constituée de trois isoformes, soient l'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3 possédant des homologies de séquence (Figure 4) (INOUE, 1989). Ces trois isoformes sont distribués dans différents tissus et possèdent des

Figure 4 Structure des endothéline-1, -2, et -3 humaines.

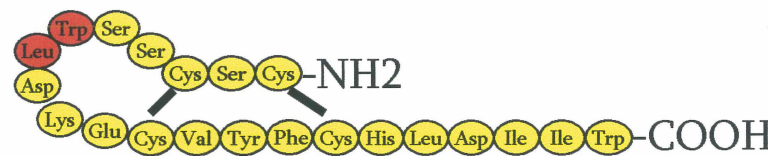
Cette figure représente les trois isoformes de l'endothéline. Les acides aminés colorés en rouge représentent les acides aminés de l'endothéline-2 et -3 qui diffèrent de ceux présents dans la structure de l'endothéline-1.

Modifié de OLDROYD et MORCOS, 2000.

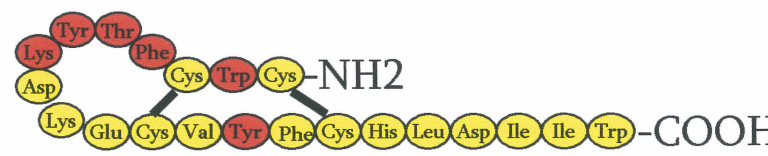
ET-1



ET-2



ET-3



actions biologiques diversifiées (RUBANYI et POLOKOFF., 1994; GRAY et WEBB, 1996). De ces trois isoformes, l'ET-1 est le plus abondant, le plus puissant et le plus étudié chez l'homme et l'animal (OLDROYD et MORCOS., 2000).

L'ET-1 est secrété par les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, les neurones ainsi que plusieurs autres types cellulaires (YANAGISAWA *et al.*, 1988; SAKAI *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1990). *In vivo*, les cellules endothéliales sont la source la plus importante d'ET-1 (KISANUKI *et al.*, 1999). L'ET-2 est exprimé au niveau des cellules épithéliales de l'intestin tandis que l'ET-3 est exprimé au niveau des cellules neuronales, épithéliales tubulaires et épithéliales intestinales (MATSUMOTO *et al.*, 1989; BAYNASH *et al.*, 1997).

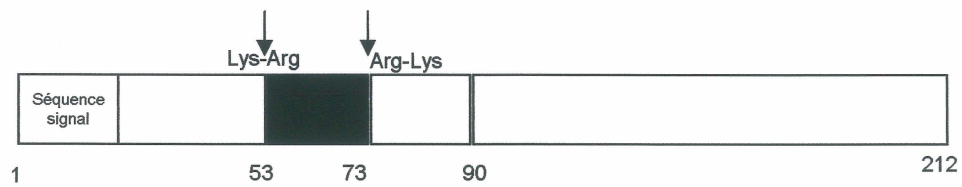
1.3.2. Biosynthèse de l'endothéline

L'ET-1 est initialement synthétisé sous la forme de préproendothéline-1, un peptide de 212 acides aminés (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Celui-ci subit un clivage protéolytique au niveau de la séquence consensus Arg-X-X-Arg entre les résidus Lys⁵²-Arg⁵³ et les résidus Lys⁹⁰-Arg⁹¹ par une endopeptidase de type furine (DENAULT *et al.*, 1995), afin d'obtenir la forme intermédiaire de 38 acide aminés, le big ET-1. Le big-ET-1 subit une transformation protéolytique à un site entre Trp⁷³-Val⁷⁴ et est convertit en ET-1 par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), une métalloendopeptidase neutre (Figure 5) (YANAGISAWA *et al.*, 1988; ITOH *et al.*,

Figure 5 Biosynthèse de l'ET-1

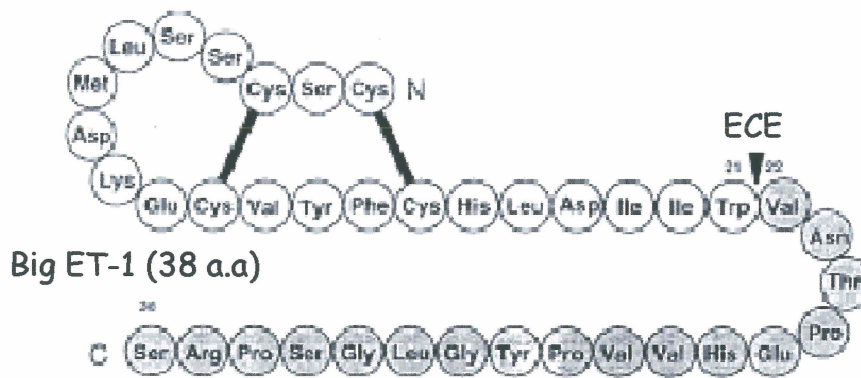
Le précurseur preproendothéline-1 subit un clivage protéolytique, par une endopeptidase de type furine, au site Arg-X-X-Arg pour former la forme intermédiaire, le big-ET-1. Puis, le big-Et-1 est spécifiquement clivé par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour former l'ET-1, la forme mature.

Modifié de GOTO et al., 1996.



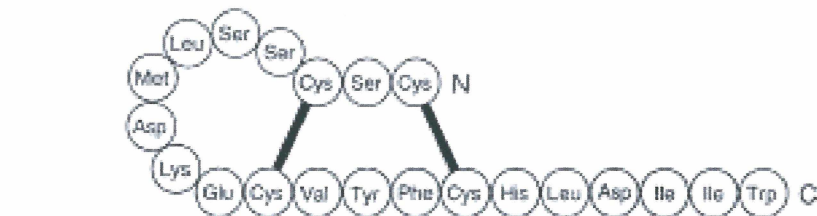
PréproET-1 (212 a.a)

endopeptidase



Big ET-1 (38 a.a)

ECE



ET-1 (21 a.a)

1988). Il est à noter que la synthèse de l'ET-2 et l'ET-3 est produite via la maturation de leur précurseur respectif, le big-ET-2 et le big-ET-3 (MASAKI, 1998).

La sécrétion de l'ET-1 est régulée d'une façon importante au niveau de la synthèse du peptide et plus spécifiquement au niveau de la transcription et la traduction de son ARNm (KEDZIERSKI et YANAGISAWA, 2001). Dans la majorité des cellules, les structures qui induisent une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'ET-1 comme : la thrombine (EMORI *et al.*, 1992), les facteurs de croissance (voir revues GORACA, 2002) , l'angiotensine II (EMORI *et al.*, 1992; KOHNO *et al.*, 1992), la vasopressine (EMORI *et al.*, 1991), l'interleukine-1 (YOSHIZUMI *et al.*, 1990), l'hypoxie (voir revues WEBB et STACHAN, 1998) et le stress mécanique (YOSHIZUMI *et al.*, 1989; KUCHAN et FRANGOS, 1993; MALEK *et al.*, 1993) au niveau de l'endothélium (SIMONSON, 1993) cause une augmentation de la sécrétion de l'ET-1 par les cellules endothéliales. Par contre, l'ARNm de l'ET-1 diminue dans les cellules endothéliales en réponse à la prostacycline (PRINS *et al.*, 1994), le NO (BOULANGER et LUSCHER, 1990) , le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) KHONO *et al.*, 1992a) et l'héparine (YOKOKAWA *et al.*, 1994; KOHNO *et al.*, 1994).

1.3.3. Les récepteurs de l'endothéline

L'ET-1 relaie ses effets via deux types de récepteurs soient les récepteurs ET_A et ET_B (HOSODA *et al.*, 1991). Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine Gαq/11 insensible à la toxine de pertussis (PTX) (GRAY et WEBB, 1996). Ces deux types de récepteurs ont été isolés et clonés (ARAI *et al.*, 1990; LIN *et al.*, 1991; SAKURAI *et al.*, 1990). Dans le système cardiovasculaire, le récepteur ET_A est localisé majoritairement au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) et des cardiomyocytes et relaie la vasoconstriction (HORI *et al.*, 1992) tandis que le récepteur ET_B se retrouve majoritairement au niveau des cellules endothéliales et des CMLVs et relaie la vasodilatation (OGAWA *et al.*, 1991). De plus, KARNE et ses collaborateurs, en 1993, ont cloné un troisième type de récepteur à l'ET-1, le récepteur ET_C, chez le *xenopus laevis*. Il est à noter que le récepteur ET_C n'est pas présent chez le mammifère (BOIVIN *et al.*, 2003).

L'affinité du récepteur ET_A pour l'ET-1 et l'ET-2 est 100 fois plus grande que pour l'ET-3, alors que le récepteur ET_B se lie avec la même affinité aux différents isoformes d'endothélines (MASAKI, 1998). Il semble que le récepteur ET_C se lie de façon préférentielle à l'ET-3 (pour plus de détails voir GIANNESSI *et al.*, 2001).

1.3.4. Le récepteur ET_A.

Chez l'humain, le gène codant pour le récepteur ET_A est localisé sur le chromosome 4 et code pour une protéine de 427 acides aminés (pour plus de détails

voir HUNLEY et KON, 2001). Jusqu'à maintenant aucun agoniste sélectif a été identifié, par contre, plusieurs antagonistes peptidiques tel que le BQ123 (IHARA *et al.*, 1992), le PD156707 (PATEL *et al.*, 1995) et non peptidiques tel que le BMS-182874 (STEIN *et al.*, 1994; ELLIOTT *et al.*, 1994) ont été développés et sont sélectifs pour le récepteur ET_A (tableau 1).

La régulation de la production des récepteurs à l'endothéline se fait en parallèle aux niveaux d'ET (LEVIN, 1995). Des études démontrent que l'hypoxie stimule la production d'ET-1 et du récepteur ET_A au niveau des cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire, respectivement (SIMONSON, 1993). D'autres études démontrent également que l'insuline ainsi que le monoxyde d'azote augmentent l'expression des récepteurs ET_A dans les cellules du muscle lisse vasculaire (FRANK *et al.*, 1993; REDMOND *et al.*, 1996). De plus, dans certains tissus, les facteurs de croissance et l'AMPc augmentent l'expression du récepteur ET_A tandis que l'Ang II diminue son expression (LEVIN, 1995).

1.3.5. Le récepteur ET_B.

Chez l'humain, le gène codant pour le récepteur ET_B est localisé sur le chromosome 13 et code pour une protéine de 442 acides aminés (ARAI *et al.*, 1993). Plusieurs agonistes sélectifs du récepteur ET_B ont été développés comme par exemple,

Tableau 1 Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs des endothélines.

ET-1 : endothéline-1, ET-2 : endothéline-2, ET-3 : endothéline-3, TM : domaines transmembranaires.

Les antagonistes en caractères gras sont de nature non-peptidique.

Modifié de :D'ORLÉANS-JUSTE et al.,1996.

Caractéristiques	ET_A	ET_B
Acides aminés	427	442
Structure	7 domaines transmembranaires	7 domaines transmembranaires
Affinité aux ETs	ET-1 = ET-2 > ET-3	ET-1 = ET-2 = ET-3
Protéine G	Gq	Gq
Gène/chromosome	ETRA/4	ETRB/13
Agonistes sélectifs	-	IRL 1620 BQ3020
Antagonistes sélectifs	BQ123 PD156707	BQ788 Ro468443

le IRL-1620 (TAKAI *et al.*, 1992) et le BQ-3020 (IHARA *et al.*, 1992). De plus, plusieurs antagonistes peptidiques sélectifs ont été développés comme par exemple le BQ-788 (ISHIKAWA *et al.*, 1994) et non-peptidiques sélectifs tel que le RO 46-8443 (CLOZEL et GRAY, 1995) (tableau 1).

L'activation du récepteur ET_B stimule la relâche du NO et de la prostaglandine (WARNER *et al.* 1989; HIRATA *et al.*, 1993), deux agents vasodilatateurs. De plus, il prévient l'apoptose (SHICHIRI *et al.*, 1997) et inhibe l'expression de ECE-1 au niveau des cellules endothéliales de rat (NAOMI *et al.*, 1998). Le récepteur ET_B médie également l'élimination de l'ET-1 circulant (FUKURODA *et al.*, 1994) ainsi que la prise de l'ET-1 par les cellules endothéliales (OZAKI *et al.*, 1995). Le récepteur ET_B peut être classifié en deux sous-types soient le récepteur ET_{B1} situé sur les cellules endothéliales, qui relaie la vasodilatation par la relâche du NO (DOUGLAS *et al.*, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 1991; SAKURAI *et al.*, 1990), et le récepteur ET_{B2} situé sur les cellules du muscle lisse vasculaire, qui relaie la vasoconstriction (SUDJARWO *et al.*, 1993; BIGAUD et PELTON, 1992; CRISTOL *et al.*, 1993). En se basant sur des données pharmacologiques, les deux sous-types de récepteurs ET_B ne sont pas des entités distinctes du point de vue moléculaire (CLOZEL et GRAY, 1995). La différence pharmacologique observée entre les deux sous-types pourrait donc être due à des différences entre les espèces ou à des modifications post-traductionnelles des récepteurs, comme la glycolysation, qui serait différente en fonction de la localisation tissulaire de ceux-ci (CLOZEL et GRAY, 1995; pour plus de détails voir CHOUFANI, 2002). Au niveau des cellules endothéliales, il a été rapporté que le TNF- α et le bFGF

(facteur de base pour la croissance des fibroblastes) augmentent l'expression du récepteur ET_B (SMITH *et al.*, 1998) tandis que l'AMPc et les catécholamines diminuent son expression (LEVIN, 1995).

1.3.6. Distribution intracellulaire des récepteurs à l'ET-1

Plusieurs études ont démontré la présence de sites de liaison à l'ET-1 au niveau des membranes de divers types cellulaires. Des études de radioliasion à l'aide du [¹²⁵I] ET-1 ont démontré la présence de sites de liaison à l'endothéline-1 au niveau de la membrane plasmique d'hépatocytes de rats isolés (HOCHER *et al.*, 1992). Cette étude a également démontré la présence de sites de liaison de l'ET-1 à haute affinité au niveau des noyaux isolés de ces mêmes cellules. L'utilisation d'une sonde fluorescente couplée à l'ET-1 a permis de démontrer que les récepteurs à l'ET-1 sont présents, non seulement au niveau de la membrane plasmique, mais également au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire des cellules cardiaques et du muscle lisse vasculaire humain (BKAILY *et al.*, 1997a; 1997b; 2002). Plus récemment, des études menées par le groupe de BKAILY en 2003 ont démontré la présence du récepteur ET_A au niveau de la membrane plasmique et du cytosol des cellules cardiaques embryonnaires de poulet et du muscle lisse vasculaire humain. Ce groupe a aussi démontré que le récepteur ET_B est présent au niveau de la membrane plasmique, du cytosol, des membranes de l'enveloppe nucléaire et du nucléoplasme des cellules du muscle lisse vasculaire humain (BKAILY *et al.*, 2003). De façon très intéressante, ce

groupe rapporte des différences entre les récepteurs à l'ET-1 au niveau de la membrane plasmique versus des membranes de l'enveloppe nucléaire; ces derniers étant plus sensibles à l'ET-1 par rapport aux récepteurs présents sur la membrane plasmique (BKAILY *et al.*, 2000; 2002). HOCHER *et al* (1992) ont également rapporté qu'au niveau des noyaux isolées d'hépatocytes de rat, la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs atteint l'équilibre après 27 min à une température de 22 ° C tandis que pour la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs au niveau de la membrane plasmique l'équilibre est atteint après 19 min à une température de 22 ° C.

1.3.7. Mécanisme de signalisation intracellulaire de l'ET-1

Il a été démontré que la liaison de l'ET-1 à son récepteur au niveau de la membrane plasmique active une protéine G hétérotrimérique insensible à la PTX probablement $G_{\alpha q}/G_{11}$ (WATSON et ARKINSTALL, 1994; GRAY et WEBB., 1996). Par contre, dans les cellules COS-7 transfectées par les récepteurs ET_A et ET_B, respectivement (TAKIGAWA *et al.*, 1995) et ainsi que dans les cellules du muscle lisse aortique de lapin (BKAILY *et al.*, 1998), les auteurs ont observé que la protéine G couplée à ces récepteurs est doublement sensible au PTX et à la CTX. (pour plus de détails voir CHOUFANI, 2002)

Il y a deux types de signalisation pour l'ET-1 : 1) une signalisation à court terme, caractérisée par le couplage excitation-contraction et/ou sécrétion (BKAILY *et*

al., 1997b) et 2) une signalisation à long terme, aboutissant à la croissance cellulaire (SOKOLOVSKY, 1995). Dans le premier cas (signalisation à court terme), après la liaison de l'ET-1 à son récepteur le couplage du récepteur à la protéine G active la phospholipase C (PLC) causant ainsi l'hydrolyse des phosphatidylinositols et la génération de l'inositol -1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (GRIENDLING *et al.*, 1989; PANG *et al.*, 1989). L'IP₃ formé cause une libération précoce du calcium du réticulum sarcoplasmique et permet une entrée du Ca²⁺ extracellulaire via les canaux calciques voltage-dépendants, de type-L localisés au niveau de la membrane plasmique (pour plus de détails voir POLLOCK *et al.*, 1995). Le DAG formé active à son tour la protéine kinase C (PKC) qui est un enzyme clef dans la régulation des fonctions cellulaires, incluant la phosphorylation de plusieurs types de canaux ioniques dont les canaux calciques de type-L (HE *et al.*, 2000). Il y a donc une augmentation du taux de calcium libre cytosolique induit par ET-1 (EBIHARA *et al.*, 1996; pour plus de détails voir NAMBI *et al.*, 1995). De plus, des études menées par BKAILY et ses collaborateurs en 1998, ont démontré que l'ET-1 augmente la concentration du calcium intracellulaire dans les cellules aortiques de lapin en activant les canaux calciques de type R. Cette augmentation du Ca²⁺ intracellulaire stimule la machinerie contractile intracellulaire ou induit la sécrétion dépendamment du type cellulaire (DE NUCCI *et al.*, 1988; NAMIKI *et al.*, 1992; pour plus de détails voir KANAIDE, 1996; MILLER *et al.*, 1993).

Dans le deuxième cas (signalisation à long terme), l'ET-1 possède des propriétés mitogéniques et ce dans plusieurs types cellulaires comme par exemple, les

cellules du muscle lisse vasculaire (BARTLETT *et al.*, 1994; BREUILLER-FOUCHE *et al.*, 1998). L'initiation de la prolifération cellulaire est reliée à l'activation de la cascade MAPK (GUTKIND, 1998). La liaison de l'ET-1 à son récepteur active la PKC qui active la cascade MAPK, constituée de raf-1, MAP Kinase Kinase et MAP Kinase (IWASAKI *et al.*, 1999). Par la suite, celle-ci se translocalise au noyau pour activer la transcription de plusieurs gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire, tel que les gènes de facteurs de transcription, c-myc et c-jun (pour plus de détails voir DOUGLAS et OHLTEIN, 1997; GOTO *et al.*, 1996).

1.4. Le calcium

Au niveau des cellules eucaryotes, le second messenger le plus répandu est le calcium (SCHWARTZ, 1990; SPEDDING et PAOLETTI, 1992). Ce dernier joue un rôle important dans la régulation des fonctions cellulaires (KATZ, 1969; CHAO *et al.*, 1992). Le calcium est essentiel au couplage excitation-contraction des cellules musculaires comme les CMLVs et les cardiomyocytes (BOLTON, 1979 ; BKAILY, 1994c ; BKAILY *et al.*, 1996, 1997b, 2000) ainsi qu'au couplage excitation-sécrétion des cellules sécrétrices comme les cellules endothéliales (voir la revue de NILIUS et DROOGMANS, 2001). Il est généralement accepté que la synthèse et/ou la relâche des pro- et anticoagulants, des facteurs de croissance, et des composés vasoactifs par les cellules endothéliales vasculaires, dépendent ou peuvent être modulés par le changement de $[Ca]_i$ (BUSSE *et al.*, 1991; CARTER et PEARSON, 1992; INAGAMI

et al., 1995; NILIUS et CATEELS, 1994; NILIUS *et al.*, 1997). Par exemple, le NO est produit par la eNOS via l'activation d'une voie Ca^{2+} /calmoduline (CaM) dépendante qui nécessite un influx calcique à travers la membrane de surface (GRAIER *et al.*, 1992; IOUZALEN *et al.*, 1996; LANTOINE *et al.*, 1998). À l'état de repos, la eNOS est inactive, et ceci est dû à sa liaison à la caveoline-1 (CAV-1) (PARTON, 1996). L'augmentation du $[\text{Ca}]_i$ favorise la liaison de la eNOS à la CaM et sa dissociation de la CAV-1 et par conséquent, son activation et le relâchement du NO (pour revue, voir les articles de FERON *et al.*, 1997; MICHEL *et al.*, 1997; MICHEL et FERON, 1997; PRABHAKAR *et al.*, 1998). D'autre part, plusieurs composés stockés dans des vésicules de sécrétion sont relâchés après la stimulation des cellules endothéliales comme par exemple le vWF (NILIUS et DROOGMANS, 2001). Ce facteur est stocké dans des vésicules de sécrétion, les corps de Weibel-Palade, et est relâché par un phénomène d'exocytose CaM-dépendant qui est déclenché suite à une augmentation du $[\text{Ca}]_i$ (BIRCH *et al.*, 1992). En résumé, la production des composés vasoactifs "sur demande" et le relâchement des composés stockés dans des vésicules de sécrétion par exocytose, nécessitent une augmentation du $[\text{Ca}]_i$ soit par une relâche des réserves intracellulaires du calcium ou soit par un influx calcique à travers la membrane de surface via l'activation des canaux calciques (pour plus de détails voir revue de NILIUS et DROOGMANS (2001).

1.4.1. Les canaux calciques dépendants du voltage.

La principale voie d'entrée du calcium dans la cellule se fait via les canaux calciques membranaires qui sont normalement à l'état fermé. Suite à une stimulation, les canaux s'ouvrent et le calcium entre dans la cellule. La littérature rapporte actuellement l'existence de six types de canaux calciques, soient les canaux calciques de type P/Q, N, R (résistant: aux bloqueurs des canaux calciques connus), L, T et R (repos) (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001).

Tous ces canaux se distinguent par leurs caractéristiques d'ouverture et de fermeture ainsi que par leurs seuils d'activation et leurs distributions dans les tissus (DAS, 1983; HOSEY et LAZDUNSKI 1988; SPEDDING et PAOLETTI 1992; BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001).

Les canaux de type P/Q s'activent à partir d'un seuil près de -40mV et possèdent une conductance de 10 à 12 pS (LLINAS *et al.*, 1989; REGAN *et al.*, 1991). Ces canaux semblent constituer la majorité des canaux calciques au niveau du cerveau où ils sont responsables, dans certaines régions, de la libération de neurotransmetteurs (HILLMAN *et al.*, 1991). Les canaux calciques de type N s'activent à partir d'un voltage de -30 mV. Ces canaux ont une conductance de 12 à 20 pS et ils produisent un courant moyen intermittent (WILLIAMS *et al.*, 1992; FUJITA *et al.*, 1993). Ils sont principalement exprimés dans les neurones et jouent un rôle important dans la libération de neurotransmetteurs (CATTERALL et STRIESSNIG, 1992). Les canaux calciques de type R (résistants) s'activent à partir d'un voltage de -30 mV et possèdent

une conductance de 15 pS (pour plus de détails voir la revue de TRIGGLE, 1999 et de FISHER et BOURQUE, 2001). Ces canaux sont aussi présents au niveau du cerveau (TAKAHASHI et MOMIYAMA, 1993; REGEHR et MINTZ, 1994; WHEELER *et al.*, 1994; WU et SAGGAU, 1994; MINTZ *et al.*, 1995) et jouent également un rôle dans la libération de neurotransmetteurs (QIAN *et al.*, 1997; JUN *et al.*, 1999).

Les canaux calciques de type L et T sont présents dans les cellules cardiaques (FOX *et al.*, 1987). Les canaux calciques de type L possèdent un seuil d'activation élevé (~ -30 mV en présence de 10 mM Ca^{2+}) et conduisent un courant lent ayant une large conductance unitaire (25 pS en 110 mM Ba^{2+}) (NOWYCKY *et al.*, 1985). Les canaux calciques de type T peuvent être activés par de faibles dépolarisations (~ -70 mV en présence de 110 mM Ca^{2+}) et possèdent une petite conductance unitaire (8 pS en 110 mM Ba^{2+}) (NOWYCKY *et al.*, 1985; MITRA et MORAD, 1986). Si on les compare au type L, le courant calcique de type T s'active et s'inactive relativement rapidement à partir d'un potentiel de membrane plus négatif. L'inactivation des canaux calciques de type L est dépendante du calcium intracellulaire tandis que pour les canaux de type T, elle est dépendante du voltage (FOX *et al.*, 1987; BKAILY, 1994).

Dans les cellules endothéliales, il ne semble pas exister de canaux calciques de type P, N, Q, R (résistant), L ou T (TAKEDA *et al.*, 1987; NILIUS et RIEMANN, 1990; TAKEDA et KLEPPER, 1990). Cependant, il a été rapporté la présence des canaux calciques de type R (repos) dans ces cellules (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a). L'existence de ces canaux calciques a été initialement suggérée par BAKER *et*

al. (1971) qui a montré que ce type de canal permettait l'entrée passive de Ca^{2+} dans la cellule pendant une dépolarisation membranaire de longue durée. Ils furent également nommés canaux calciques du potentiel de repos (R) par DIPOLLO en 1979. Contrairement aux autres types de canaux calciques dépendants du voltage, les canaux calciques de type R n'ont pas de porte d'inactivation (DIPOLLO, 1979; BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1997a). Ces canaux sont activés lors d'une dépolarisation soutenue de la membrane cellulaire et possèdent une conductance de 24 pS (BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1997a).

Dans les cellules du muscle lisse vasculaire, une dépolarisation soutenue de la membrane produit une augmentation transitoire rapide de calcium intracellulaire qui est suivie par une phase soutenue (BKAILY *et al.*, 1992). La première phase est abolie par les bloqueurs des canaux calciques de type L comme la nifédipine et de type L et R comme l'isradipine (BKAILY *et al.*, 1992). Cependant, la phase soutenue est insensible à la nifédipine, à la caféine ainsi qu'à d'autres bloqueurs calciques, mais est sensible à l'isradipine et à l'EGTA, un chélateur de calcium (BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1992). Les canaux calciques de type R sont responsables des augmentations soutenues de calcium durant la contraction soutenue du muscle lisse vasculaire par différents agents vasoactifs et proinflammatoires comme le PAF, l'ET-1 ainsi que l'insuline (BKAILY *et al.*, 1992, 1993; BKAILY, 1994a et 1994b; TAOUDI-BENCHECROUN *et al.*, 1995). De plus, l'influx de calcium via les canaux calciques de type R est principalement responsable du maintien de la concentration du calcium intracellulaire normale physiologique et du tonus de base du muscle lisse vasculaire

(BKAILY, 1991). Il a été également rapporté que ces canaux semblent être impliqués dans des phénomènes de sécrétion basale de l'endothélium vasculaire (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a).

1.5. L'ET-1 et l'endothélium endocardique.

L'ET-1, le vasoconstricteur le plus puissant, est un peptide de 21 acides aminés qui est distribué dans divers tissus et accomplit plusieurs actions biologiques. Chez l'humain, ses effets sont relayés via deux types de récepteurs ET_A et ET_B. WANG et MORGAN en 1992, ont étudié la réponse contractile des muscles papillaires isolé du ventricule droit du furet adulte, en présence et en absence de l'EE. La dénudation des CEEs du muscle papillaire provoque une diminution de la tension maximale et d'une abréviation de la durée de la contraction, cependant, ces effets ont été renversés suite à l'ajout de l'ET-1. Par la suite, des études ont montré que des CEEs isolées de ventricule de chèvre expriment l'ARNm de l'ET-1 et secrètent une quantité suffisante d'ET-1 pour exercer un effet inotrope positif sur des cardiomyocytes isolés de cette même espèce (MEBAZAA *et al.*, 1993a). De plus, d'autres études ont démontré la présence de l'ARNm des récepteurs ET_A et ET_B au niveau de l'EE ventriculaire (MOLENAAR *et al.*, 1993). Récemment en 2002, WENDEL-WELLNER et ses collaborateurs ont démontré, à partir d'une coupe de tissu congelé et à l'aide de l'immunofluorescence indirecte, la présence du récepteur ET_B au niveau des CEEs ventriculaires adultes humaines sans indiquer l'origine ; ventricule droit ou gauche.

D'autres études montrent la présence de l'ARNm de l'ET-1 au niveau de l'EE de l'oreillette droite et du ventricule gauche adulte humain (SAETRUM OPGAARD *et al.*, 2001). De plus, des études en immunofluorescence montrent une distribution de l'ET-1 confinée au niveau cytoplasmique des CEEs isolées de l'oreillette droite et du ventricule gauche de porc (SAETRUM OPGAARD *et al.*, 2001).

1.6. Résumé de la littérature et hypothèse et objectifs de travail.

L'ET-1, un peptide de 21 acides aminés, est le vasoconstricteur le plus puissant isolé jusqu'à date. L'ET-1 se retrouve dans plusieurs tissus et joue divers rôles. Chez l'humain, ces effets sont relayé via deux types de récepteurs : les récepteurs ET_A et ET_B. Au niveau du système cardiovasculaire, la majorité des travaux effectués ont étudié l'effet de l'ET-1 sur le muscle cardiaque, le muscle lisse vasculaire et l'endothélium vasculaire. Cependant, aucune étude n'a démontré l'effet de l'ET-1 sur l'EE qui tapisse les cavités cardiaques et qui joue un rôle important dans la régulation de la fonction cardiaque. Dans notre laboratoire, nous avons développé des cultures primaires de cellules endothéliales isolées, à partir du ventricule droit et gauche du cœur foetal humain âgé de 20 semaines. Nous avons récemment démontré que ces cellules possèdent des récepteurs au neuropeptide Y (NPY) ainsi que du NPY lui-même (JACQUES *et al.*, 2003). D'autres part, nous avons observé des différences entre les CEEDs et CEEGs en ce qui concerne la distribution et la contribution du NPY et de ses récepteurs à la modulation du Ca²⁺ intracellulaire des CEEs (JACQUES *et al.*,

2003). De plus, nous avons rapporté que les CEEs possèdent les récepteurs AT_1 et AT_2 ainsi que l'Ang II (JACQUES *et al.*, 2003) et que des différences existent dans la sensibilité à l'Ang II et son effet sur le $[Ca]_i$ (ABDEL-MALAK, 2003). Il existe aussi d'autres évidences dans la littérature montrant des différences entre les CEEDs et les CEEGs. Par exemple, il a été rapporté que la relâche de la PGI_2 est plus élevée au niveau des CEEGs par rapport au CEEDs isolées de ventricules de coeur de porc adulte (NOSAKA *et al.*, 1997). De plus, il semble que l'expression des récepteurs et les sites de liaison au peptide natriurétique (ANP) sont plus abondants au niveau des CEEDs qu'au niveau des CEEGs isolées des ventricules du coeur de rat adulte (KIM *et al.*, 1999). Étant donné toutes ces preuves expérimentales, le but de ce mémoire est de tester l'hypothèse suivante : comme le NPY, l'AngII et ses récepteurs, l'ET-1 ainsi que ses récepteurs ET_A et ET_B sont présents au niveau des CEEs du coeur fœtal humain âgé de 20 semaines. De plus, leurs densités, distributions et leurs effets sur le Ca^{2+} intracellulaire sont différents dans les CEEs isolées à partir du ventricule droit (CEEDs) par rapport à celles isolées du ventricule gauche (CEEGs). Afin de tester cette hypothèse, nous proposons de répondre aux questions suivantes:

- 1-Est-ce que les cellules endothéliales endocardiques contiennent l'ET-1?
- 2- Est-ce que les cellules endothéliales endocardiques contiennent les récepteurs ET_A et ET_B ?
- 3- Est-ce que ces récepteurs sont localisés préférentiellement sur la membrane de surface et/ou nucléaire?
- 4- Est-ce qu'il existe une différence entre les CEEDs et les CEEGs en terme de densité et de distribution de l'ET-1 et de ses récepteurs ET_A et ET_B ?

5- Est-ce que la stimulation des récepteurs à l'ET-1 module le calcium intracellulaire $[Ca]_i$ au niveau des CEEDs et des CEEGs?

6- Est-ce que la stimulation des récepteurs à l'ET-1 module le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ au niveau des CEEDs et des CEEGs?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé des CEEs isolées à partir des ventricules droit et gauche de cœur foetaux humains âgés de 20 semaines. Les techniques utilisées sont l'immunofluorescence indirecte, l'immunobuvardage western, la méthode de mesure du $[Ca]_i$ en utilisant une sonde calcique ratio métrique le fura-2/AM, ainsi que l'imagerie en deux dimensions et la méthode de mesure du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ en utilisant la sonde calcique le fluo-3/AM, ainsi que l'imagerie tridimensionnelle générée par la microscopie confocale.

II. MATÉRIEL ET METHODES

2.1. Isolation et culture des cellules endothéliales endocardiques du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.

Les cellules endothéliales endocardiques sont isolées à partir du ventricule droit et gauche (CEEDs et CEEGs, respectivement) du cœur foetal humain âgé de 20 semaines en utilisant la trypsine et des méthodes mécaniques (JACQUES *et al.*, 2000; BKAILY *et al.*, 1997b). La procédure est en accord avec les recommandations sur comité sur l'utilisation des matériaux humains.

Les cœurs fœtaux humains sont prélevés dans des conditions aseptiques. Ils sont immédiatement déposés dans un bûcher contenant une solution stérile de S-MEM (Milieu Essentiel Minimal de Suspension) ayant la composition suivante: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄ (Gibco BRL; Burlington, ON) et supplémentée de Penicilline-G-Potassium (Ayerst; Montréal, QC). Par la suite, les ventricules sont disséqués et nettoyés du sang avec du milieu M199 (Gibco BRL, Burlington, ON) stérile. Afin d'isoler les CEEDs et les CEEGs, les ventricules ouverts sont placés dans une boîte de pétri de culture avec leur face luminale dirigée vers le haut, et sont par la suite exposés à 0.05% de trypsine (Whittaker; Walkerville, MD) pour 5 minutes. L'endothélium endocardique des deux côtés ventriculaires est ensuite gratté délicatement avec la lame d'un scalpel. Les cellules grattées sont lavées avec du milieu M199 supplémenté de 10% FBS (sérum bovin fœtal) (Gibco BRL, Burlington, ON). Après une centrifugation de 10 min à 1000 rpm (révolution par min), le milieu de culture est éliminé et le culot de cellules est suspendu dans un milieu M199

supplémenté de 10 % de FBS. Par la suite, les cellules sont dispersées dans des pétris (JACQUES *et al.*, 2000). Pour les études sur des cellules fraîchement isolées, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre disposées dans des pétris de 35 mm de diamètre, ou bien directement dans des pétris de 100 mm (BKAILY *et al.*, 1992), et elles sont incubées à 37°C et 5% CO₂. Pour produire des cultures cellulaires primaires, les CEEDs et les CEEGs sont cultivées dans des flacons de culture (Gibco BRL, Burlington, ON) et incubées comme ci-haut mentionné. À confluence, les cellules sont détachées par trypsinisation et recultivées dans du milieu M199 supplémenté de 10% de FBS (JACQUES *et al.*, 2000; BKAILY *et al.*, 1997).

Une vérification de la qualité et de la pureté des CEEDs et des CEEGs est faite en utilisant une sonde fluorescente spécifique aux résidus α -fucose présents dans le glycocalyx des cellules endothéliales. Cette sonde est la "Lectin Ulex Europeans Agglutinin" conjuguée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (6 μ g/ml pour 2 heures à la température de la pièce; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) (JACQUES *et al.*, 2000; BKAILY *et al.*, 1997b). Les CEEDs et CEEGs se caractérisent par la présence d'un réseau bien développé de réticulum endoplasmique et d'un grand nombre de mitochondries qui entourent un noyau volumineux (BKAILY *et al.*, 1999; JACQUES *et al.*, 2000). Ces cellules possèdent aussi un canal calcique de type R fonctionnel, insensible à la nifédipine mais sensible à l'isradipine (JACQUES *et al.*, 2000).

2.2. Mesure du calcium intracellulaire

Le fura-2/AM est une sonde calcique ratiométrique ayant une haute affinité et spécificité pour le Ca^{2+} (Tsien, 1989). Les indicateurs ratiométriques permettent la comparaison de l'ion liée avec la sonde versus l'ion non liée à la sonde, permettant ainsi une détermination plus précise de la concentration de l'ion. Le fura-2 est excité à une longueur d'onde de 340 nm lorsqu'elle est liée au Ca^{2+} tandis qu'elle est excité à 380 nm lorsque celle-ci est libre, i.e. non lié au Ca^{2+} . Le ratio de la fluorescence obtenu représente le fura-2 liée au Ca^{2+} versus le fura-2 non-liée au Ca^{2+} (340/380). Le fura-2 a une seule longueur d'onde de transmission soit de 510 nm (GRYNKIEWICZ *et al.*, 1985).

2.2.1. Préparation des cellules

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre qui conviennent à leur montage dans une chambre de 1 ml. Les cellules sont lavées trois fois avec 2 ml d'une solution de Tyrode normale (Sigma, St Louis, MO) ayant comme composition : 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.9 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, 5.6 mM glucose, pH 7.4 contenant 0.1% de BSA (albumine de sérum bovin) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). L'osmolarité de la solution de Tyrode avec ou sans BSA est ajustée à 310 mOsm avec du sucrose à l'aide d'un osmomètre (Advanced Instruments Inc., MA).

La sonde calcique, fura-2/AM (1mM) (Calbiochem, La Jolla, CA), est diluée dans une solution de Tyrode contenant du BSA et de sulfoxide dimethyl (DMSO) (Fisher, Montréal, QC) pour obtenir une concentration finale de fura-2/AM de 1µM, et de DMSO de 0.1% (CORNWELL et LINCOLN, 1989).

Les cellules sont incubées, en présence de 1µM de fura-2/AM pour une période de 60 minutes à 37°C. Après la période d'incubation, les cellules sont lavées deux fois dans la solution Tyrode-BSA et deux fois dans la solution Tyrode seule. Les cellules chargées sont ensuite incubées 20 min dans la solution Tyrode afin de s'assurer de l'hydrolyse totale des groupements acétoxyméthyls esters et ainsi d'éliminer la forme estérifiée de la sonde calcique (forme AM de la sonde fura-2/AM) qui est incapable de lier le Ca^{2+} libre. Après l'hydrolyse, les cellules sont lavées une fois avec de la solution Tyrode normale, et la lamelle est montée dans un milieu de montage de 1 ml auquel on ajoute 1 ml de solution Tyrode normale.

2.2.2. Microscopie à fluorescence

Les cellules sont visualisées à l'aide d'un microscope à contraste de phase inverse (Nikon, Japon) qui illumine l'échantillon soit à l'aide d'une lumière visible ou d'une lampe xenon (permettant de visualiser la fluorescence). Les échantillons sont visualisés en utilisant la lampe ultraviolet jusqu'à ce qu'une cellule appropriée soit sélectionnée, minimisant ainsi l'exposition de l'échantillon à la lumière visible. La

sélection des cellules est basée sur leur morphologie et sur leur niveau de $[Ca^{2+}]_i$. Normalement, les cellules ayant une $[Ca^{2+}]_i$ situé entre 50 et 200 nM ont été utilisées.

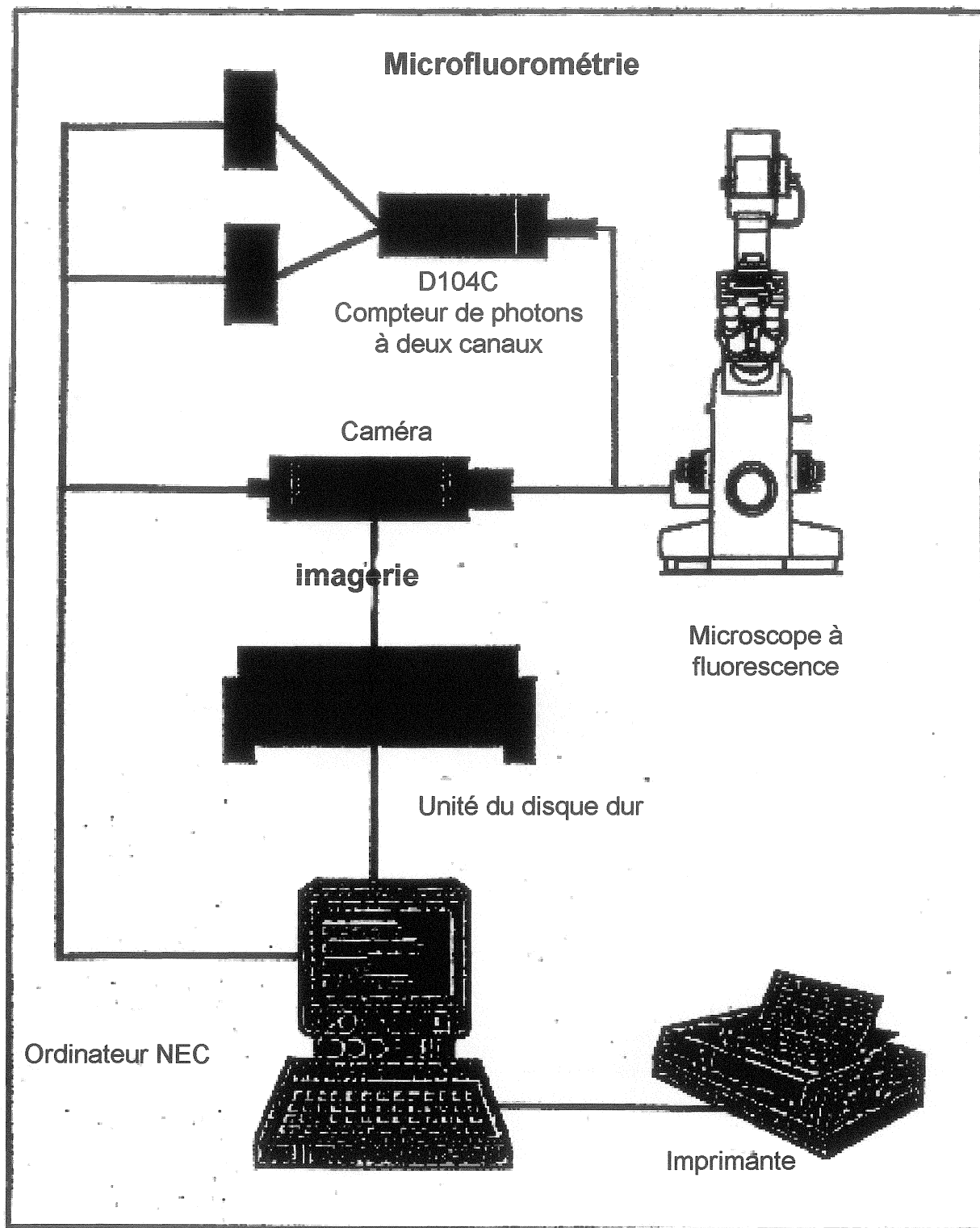
Les mesures en microfluométrie sont effectuées à l'aide d'un compteur de photon (Photon Technology International (PTI) New Jersey). Celui-ci est relié à un ordinateur NEC équipé d'un programme Deltascan (PTI) qui contrôle l'appareil et fait l'acquisition des données. Les données sont acquises à une vitesse de 2 points par seconde en terme de ratio (340/380). Cette technique permet la mesure précise du $[Ca^{2+}]_i$ d'une seule cellule et ce, de façon continue.

Le système d'imagerie permet de mesurer la $[Ca^{2+}]_i$ de plusieurs cellules. Les mesures de la fluorescence émise sont faites à l'aide d'une caméra au lieu d'un compteur de photon. Les changements du $[Ca^{2+}]_i$ peuvent être visualisés en temps réel, cependant due à des raisons d'ordre pratique, les images sont enregistrées à des intervalles de temps donné. Un processeur d'images converti la fluorescence détectée en une carte de couleur. Cette carte de couleur est transmise à un moniteur d'ordinateur et exprimé comme une image de couleur digitalisée. Le programme «Imagescan» (PTI), installé dans un ordinateur, permet le contrôle de l'appareil et la conversion et l'expression des données (figure 6). L'intensité de fluorescence, exprimé en ratio (340/380) peut être déterminé visuellement de façon approximative en corellant la carte digitale de couleur de l'image à une échelle de pseudocouleur. La couleur bleue représente l'intensité de fluorescence la plus faible tandis que le magenta

Figure 6 Représentation schématique du système de mesure de fluorescence

L'échantillon sur le microscope à contraste de phase inverse est excité par une lampe xénon. La fluorescence émise est acheminée soit à travers un compteur de photon à deux canaux pour la microfluométrie où soit à travers une caméra pour l'imagerie en deux dimensions. Le système est contrôlé par un ordinateur qui emmagasine les données.

(Modifié de ECONOMOS, 1992)



représente l'intensité de fluorescence maximale. L'intensité de fluorescence peut être convertie en concentration de calcium en utilisant l'équation de GRYNKIEWICZ et al (1985) soit :

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \beta \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)}$$

Où le K_D est la constante de dissociation du fura-2 (135 nM) et β est le coefficient de proportionnalité entre le fura-2 lié et celui non lié au Ca^{2+} intracellulaire égale à 1. Le R est le ratio mesuré. Le R_{\max} (réponse maximale de la cellule) est obtenu en perforant la membrane de la cellule, avec l'ionomycine (10^{-5}M), en présence de la solution Tyrode expérimentale contenant 2 mM du Ca^{2+} . Cette perforation permet à tout le fura-2 chargé à l'intérieur de se lier au Ca^{2+} et ainsi émettre la fluorescence maximale d'une cellule. Par la suite le R_{\min} (réponse minimale de la cellule) est déterminé en chélatant le Ca^{2+} intracellulaire à l'aide du chélateur du Ca^{2+} , l'EGTA afin de déterminer l'intensité de fluorescence des molécules de fura-2 intracellulaire non-liées au Ca^{2+} . Cette dernière est aussi importante car elle peut nous donner une idée si de l'auto fluorescence est émise par des molécules présentes dans la cellule.

2.3. Microscopie confocale.

La microscopie confocale offre plusieurs avantages significatifs sur la microscopie à fluorescence conventionnelle: elle permet la génération d'images optiques sériées par élimination de la lumière hors foyer (BKAILY *et al.*, 1997b; NIGGLI et LEDERER, 1991) et offre une résolution d'environ 30% supérieure au

microscope conventionnel. Elle permet entre autre un sectionnement non-invasif d'échantillons biologiques ainsi que leur reconstruction en trois dimensions sous n'importe quel angle ou plan de coupe (NIGGLI *et al.*, 1994). Le système confocal utilisé au cours de cette étude est un Multi Probe 2001 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) muni d'un laser à argon équipé d'un microscope à épifluorescence à phase inverse (Diaphot Nikon) et d'un objectif achromat (Nikon Oil Plan) de 60 X.

2.3.1. Principe de base.

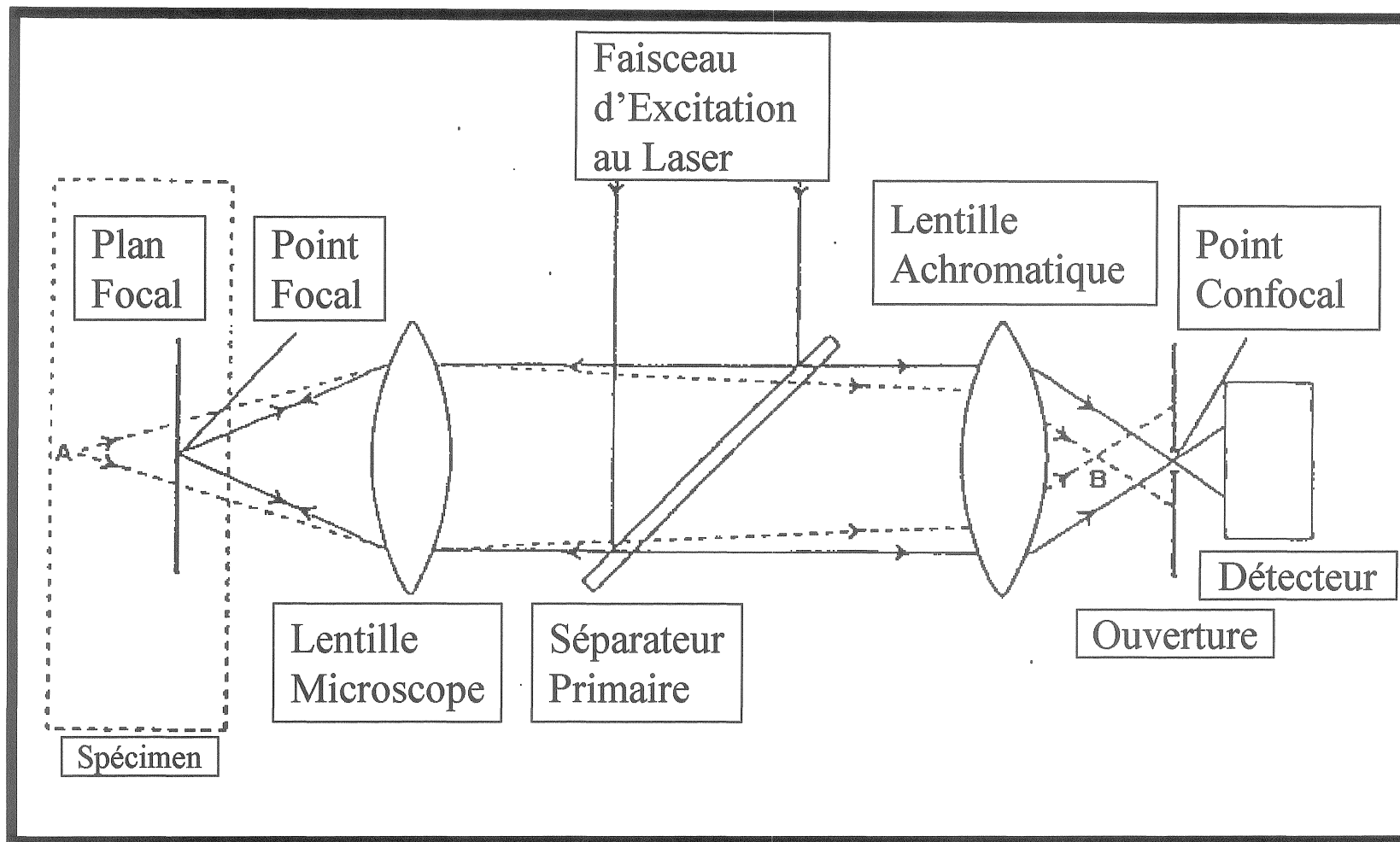
Dans le système confocal, la lentille du microscope dirige le faisceau de lumière laser vers un point donné de l'échantillon, appelé le point focal (figure 7). La lumière émise (ou réfléchi) par ce point reprend le même chemin à travers le microscope. Les compartiments optiques du microscope focalisent la lumière de ce point vers un deuxième point, appelé le point confocal. Un système de volets ou ouvertures, positionné au point confocal, ne laisse passer que la lumière provenant du point focal de se rendre au détecteur. Toute lumière incidente provenant de points au-dessus ou en dessous du plan focal, et par conséquent hors foyer, est rejetée par l'ouverture confocale (Manuel d'utilisation du microscope Multi probe 2001).

2.3.2. Balayage des cellules.

Figure 7 Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.

Dans le système de la microscopie confocale, la lumière d'excitation venant du laser passe par un séparateur primaire et est convergée par les lentilles du microscope au point focal de l'échantillon. Une faible quantité de lumière du laser converge sur d'autres points du plan focal. La fluorescence provenant de l'échantillon repasse par le séparateur primaire afin de séparer la fluorescence émise de celle qui est reflétée. La fluorescence émise est convergée par la lentille achromatique au point confocal et est enregistrée par le détecteur. Tout rayon frappant l'ouverture à des points autres que le point confocal n'est pas détecté.

(modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001).



Le laser d'argon (9.0 mV), à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm, est dirigé sur l'échantillon via un filtre dichroïque primaire de 510 nm et est atténué avec un filtre de densité neutre de 1-3% afin de réduire la défluorescence. L'ouverture confocale est de 100 μm .

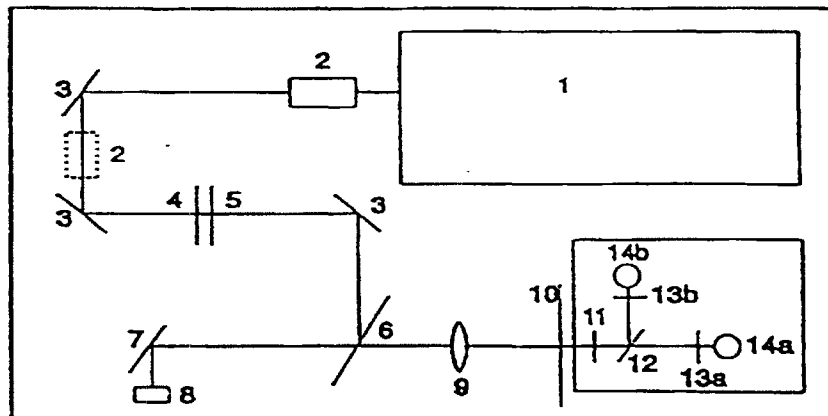
Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34 μm . L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales (figure 8). Les cellules sont balayées le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau basal de l'intensité de fluorescence ainsi que de la réponse cellulaire suite à l'ajout de différents agents, dans le cytosol aussi bien que dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1997b).

2.4. Chargement des cellules avec la sonde calcique fluo-3.

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre qui conviennent à leur montage dans une chambre de 1 ml. Les cellules sont lavées trois fois avec 2 ml d'une solution de Tyrode (Sigma, St Louis, MO) ayant comme composition : 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.9 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, 5.6 mM glucose, pH 7.4 contenant 0.1% de BSA (albumine de sérum

Figure 8 Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale.

(Modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001)



1. Laser
2. Extenseur de faisceau
3. Miroirs
4. Roulette de filtres d'émission
5. Roulette de filtres d'atténuation
6. Séparateur de faisceau primaire
7. Miroir à balayage lent
8. Miroir à balayage rapide
9. Lentilles achromatiques
10. Roulette d'ouverture confocale
11. Filtre de barrière
12. Séparateur de faisceau dichroïque secondaire
- 13 a) Filtre détecteur 1
- 13 b) Filtre détecteur 2
- 14 a) Détecteur PMT 1
- 14 b) Détecteur PMT 2

bovin) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). L'osmolarité de la solution de Tyrode avec ou sans BSA est ajustée à 310 mOsm avec du sucrose à l'aide d'un osmomètre (Advanced Instruments Inc., MA).

La sonde calcique, fluo-3/AM (Molecular Probes, Eugene, OR), est diluée dans une solution de Tyrode contenant du BSA à partir d'une solution stock congelée de 1 mM: la concentration finale de la sonde utilisée est de 13 μ M (BKAILY *et al.*, 1997b).

Les cellules sont incubées, suivant la méthode de lamelle renversée, en présence de 100 μ l de sonde diluée placée sur une plaque de verre enveloppée de parafilm, pendant 60 minutes. L'incubation se fait, à l'abri de la lumière, dans un environnement humide afin de minimiser l'évaporation de la sonde calcique (BKAILY *et al.*, 1997b).

Après la période d'incubation, les lamelles sont récupérées et les cellules sont lavées deux fois dans la solution Tyrode-BSA puis deux fois dans la solution Tyrode seule. Les cellules chargées sont ensuite laissées dans la solution Tyrode pour 15 min afin de s'assurer de l'hydrolyse totale des groupements acétoxyméthyls esters et ainsi éliminer la forme estérifiée de la sonde calcique (forme AM de la sonde fluo-3/AM) qui est incapable de lier le Ca²⁺ libre (BKAILY *et al.*, 1997b).

2.5. Marquage du noyau.

À la fin de chaque expérience, le noyau est marqué avec le Syto-11, un marqueur des acides nucléiques (Molecular Probes, Eugene, OR), à une concentration de 100 nM. Les cellules sont balayées par sections sériées immédiatement après le développement du marquage (8-10 min). La position, le nombre de sections ainsi que l'incrément entre ces dernières sont maintenus identiques à ceux utilisés au cours de l'expérience. Une reconstruction en trois dimensions du noyau est réalisée afin de délimiter le calcium nucléaire du calcium cytosolique (BKAILY *et al.*, 1997b).

Les images balayées sont transférées à une station d'analyse Indy de Silicon Graphics équipée d'un logiciel d'analyse et de reconstruction « Imagespace » de Molecular Dynamics. La reconstruction des images en 3D est présentée en projection d'intensité maximale générant une série d'images montrant l'intensité maximale des unités voxels (BKAILY *et al.*, 1997b).

Les images des cellules chargées au fluo-3 sont représentées en pseudocouleur suivant une échelle d'intensité allant de 0 à 255 où le noir indique l'intensité zéro et le blanc l'intensité maximale. Les mesures de calcium dans le noyau sont effectuées sur des images individuelles et sur des reconstructions en 3D (sections sériées). La région du noyau, marquée au Syto-11, est isolée du reste de la cellule en fixant un seuil inférieur d'intensité afin de délimiter les pixels de cet espace. Une série d'images binaires du volume nucléaire est générée en 3D pour chaque cellule en utilisant les mêmes paramètres pour les positions x, y, et z que ceux utilisés pendant les mesures calciques. En appliquant ces images binaires aux cellules chargées avec la sonde

calcique, une nouvelle projection en 3D est créée montrant les niveaux d'intensité de fluorescence exclusivement dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1996; 1997b).

En isolant le noyau de la région cytosolique environnante, il est donc possible de mesurer les valeurs d'intensité moyenne du volume nucléaire en éliminant toute contribution possible du calcium périnucléaire.

2.6. Marquage par immunofluorescence.

2.6.1. Marquage de l'ET-1.

La localisation et la distribution de l'ET-1 au niveau des CEEDs et des CEEGs sont effectuées en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps monoclonal de souris spécifique dirigé contre l'ET-1 humaine (Biodesign Inc., Saco, Maine). Cet anticorps ne montre aucune réaction croisée avec le big-ET-1 et/ou le prépro-ET-1. Cet anticorps est utilisé à une dilution de 1/100. L'anticorps secondaire est un anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) qui est utilisé à une dilution de 1 µg/ml.

Pour déterminer la spécificité de l'immunoréactivité obtenue, des contrôles négatifs sont réalisés en préabsorbant l'anticorps primaire avec le peptide contrôle (10^{-5} M) (American peptide company Inc., Sunnyvale, California), peptide contre lequel

l'anticorps primaire a été dirigé et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul.

2.6.2. Marquage des récepteurs ET_A et ET_B.

La localisation ainsi que la distribution des récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CEEDs et des CEEGs sont réalisées avec la technique d'immunofluorescence indirecte. Des anticorps polyclonaux dirigés contre l'extrémité C-terminale du récepteur ET_A (Alomone labs, Jerusalem, Israël) (dilution de 1:100), et contre l'extrémité la troisième boucle intracellulaire des récepteurs ET_B (Alomone labs, Jerusalem, Israël) (dilution de 1 :100) sont utilisés. L'anticorps secondaire pour les deux sous-types de récepteurs est un anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) qui est utilisé à une dilution de 1µg/ml.

Pour déterminer la spécificité de l'immunoréactivité obtenue, des contrôles négatifs sont réalisés en utilisant les peptides contrôles (Alomone labs, Jerusalem, Israël) contre lesquels l'antisérum ET_A et ET_B ont été dirigés et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul.

2.6.3. Technique de l'immunofluorescence indirecte.

La technique utilisée a été modifiée de BRISMAR *et al.* (1998). En bref, les CEEDs et les CEEGs mises en culture sur des lamelles de 25 mm sont fixées pendant 10 min dans une solution de 4% de paraformaldéhyde (Cedarlane, Homby, ON) et sont ensuite lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS 1X, pH 7.4. Les cellules à étudier sont ensuite incubées pendant 10 min dans une solution de sodium borohydrure (2mg/ml) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) afin de neutraliser les groupements aldéhydes, et sont lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS. Afin de perméabiliser les cellules et de bloquer les sites de liaison non-spécifique, les cellules sont incubées pendant 30 min dans une solution de 0.1% de Triton contenant 7% de sérum normal de chèvre (NGS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) et 5% de lait écrémé en poudre (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) à la température de la pièce. Par la suite, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire à 4°C pendant toute la nuit dans une solution de 0.1% de Triton 0.1% contenant 1.4 % de NGS et 1 % de lait écrémé en poudre. Les préparations sont ensuite lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS et sont incubées pendant une heure à la température de la pièce et à l'obscurité avec un anticorps secondaire fluorescent dans une solution de Triton 0.1% contenant 1.4 % de NGS et 1 % de lait écrémé en poudre (BRISMAR *et al.*, 1998). Finalement, les cellules sont visualisées en utilisant la microscopie confocale.

2.6.4. Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale.

Pour la visualisation et la quantification de l'intensité de fluorescence par microscopie confocale, les cellules sont mises en culture sur des lamelles de 25 mm de diamètre qui conviennent à la chambre d'expérimentation de 1ml de solution tampon (PBS). Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34µm. L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales. Les échantillons sont balayés le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau de l'intensité de fluorescence (BKAILY *et al.*, 1997b).

Les paramètres utilisés pour la visualisation et la mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde FITC par microscopie confocale sont les mêmes que les paramètres utilisés pour les mesures du Ca^{2+} avec le complexe fluo-3/ Ca^{2+} . L'ouverture confocale est toujours de 100 µm. Les mesures de l'intensité de fluorescence sont exprimées soit en valeurs absolues selon l'échelle de pseudocouleur allant de 0 à 255, soit en pourcentage par rapport au contrôle.

2.7. Immunobuvardage western.

2.7.1. Extraction des protéines.

Pour les analyses d'expression des protéines des récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CEEDs et des CEEGs, les cellules sont mises en culture dans des pétris de 100 mm. Une fois à confluence, les cellules traitées sont grattées et solubilisées dans du tampon Laemmli 1X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% de sulfate de sodium dodécyl (SDS) , 10% de glycérol, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 0.005% de bleu de bromophénol, 5% de 2-β-mercaptoéthanol).

Les lysats cellulaires de la préparation sont par la suite bouillis pendant 5 min et soniqués. Les concentrations protéiques de chacun des lysats sont déterminées en utilisant le "Bicinchoninic acid protein assay reagent" (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Une courbe standard est établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA) effectuée en parallèle pour chaque dosage. Il est à noter que tous les échantillons sont dosés en duplicata.

2.7.2. Technique de l'immunobuvardage western.

Des quantités équivalentes de protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de 10% de polyacrylamide (Tableau 2).

Tableau 2 Composition des gels utilisés en immunobuvardage western.

Produits	Gel d'entassement (4% acrylamide)	Gel de séparation
Acrylamide	1.33 mL	7.5 mL
Tampon de migration 4X	-	7.5 mL
Tampon d'entassement 4X	2.5 mL	-
SDS 10%	0.1 mL	0.3 mL
Eau bidistillée	6.0 mL	14.6 mL
Ammonium persulfate 10%*	50 µL	150 µL
TEMED*	5 µL	10 mL

* Ces deux produits de polymérisation sont ajoutés au mélange au moment de couler le gel entre les plaques.

TEMED: N, N, N', N' - Tetraméthyléthylènediamine.

Le gel de séparation est recouvert d'une solution protectrice lors de la polymérisation, qui peut être de l'eau bidistillée ou du butanol. Cette couche, en isolant le gel de l'air, permet une polymérisation homogène.

Les échantillons (50 µg) sont bouillis pendant 5 min avant d'être chargés dans les puits. La migration des protéines dure environ 4 heures. Le poids moléculaire des protéines est déterminé par une comparaison avec la migration d'un marqueur du poids moléculaire (15 à 200 kD; Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON).

Le transfert des protéines est effectué sur une membrane de nitrocellulose (Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, QC) pendant 2 heures à une puissance de 200 watts dans un tampon de transfert ayant la composition suivante: 25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% SDS. À la fin du transfert, la membrane est récupérée et les protéines sont colorées au rouge Ponceau (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) pour visualiser les bandes et s'assurer du succès du transfert. Par la suite, ces bandes sont décolorées par 2 ou 3 lavages successifs avec de l'eau (DESCHÊNES *et al.*, 2001).

2.7.3. Détection des antigènes.

Pour bloquer les sites antigéniques non spécifiques, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant au moins 2 heures à 25°C dans du PBS (1X: 137

mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4), contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0.05% de Tween-20. La membrane est ensuite incubée pour toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires pour le récepteur ET_A ou ET_B qui sont dilués dans la solution de blocage à une dilution de 1/200 et une concentration de 10 µg/mL, respectivement.

Après trois rinçages de 10 minutes avec 0.05% PBS-Tween, la membrane est incubée pour environ une heure à la température ambiante et en présence de l'anticorps secondaire, un anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, QC). Il est à noter que celui-ci est dilué dans la solution de blocage dans un rapport de 1:5000. Par la suite, la membrane est lavée 2 fois pendant 10 minutes avec 0.05 % PBS-Tween. Elle est ensuite lavée une fois avec du PBS sans Tween. Par la suite, les complexes immuns sont détectés par chemiluminescence (ECL, Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN). L'énergie dégagée sous forme de lumière est visualisée par exposition sur film d'autoradiographie de type BIOMAX MR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) (DESCHÊNES *et al.*, 2001).

Pour chaque western, et afin de s'assurer que les quantités de protéines chargées dans les puits sont équivalentes, un contrôle est réalisé avec l'actine selon la méthode suivante: la membrane contenant les anticorps primaires et secondaires utilisés pour détecter la bande du récepteur ET_A ou du récepteur ET_B, est hydratée avec de l'eau distillée, lavée 3 fois avec de la glycine (0.1M pH 2.9) et incubée avec celle-ci pendant 30 min. La membrane est ensuite lavée 3 fois avec du PBS (1X), puis incubée avec du

PBS (1X) contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0.05% de Tween-20 à la température ambiante pour 3 heures, période durant laquelle les anticorps utilisés pour le récepteur ET_A ou le récepteur ET_B se détachent de la membrane. Celle-ci est alors marquée comme décrit précédemment pour la bande du récepteur ET_A et du récepteur ET_B, mais cette fois en utilisant un anticorps primaire monoclonal de souris (Abcam Limited, UK) dirigé contre la région la plus conservée de l'actine, à une dilution de 1/20000. L'anticorps secondaire utilisé est un IgG anti-souris conjugué à la peroxidase développé chez la chèvre et purifié par affinité (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Cet anticorps est utilisé à une dilution de 1/1000. La bande de l'actine est détectée par chemiluminescence comme décrit précédemment pour s'assurer que les quantités de protéines dans chaque puits sont équivalentes.

2.8. Statistiques.

Les niveaux d'intensité du calcium libre cytosolique et nucléaire ainsi que du marquage de l'ET-1 et des récepteurs ET_A et ET_B, sont représentés comme des valeurs moyennes d'intensité relative de fluorescence ou comme pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au contrôle. Tous les résultats sont exprimés en moyennes \pm E.S.M (Erreur Standard de la Moyenne) et le n est le nombre de cellules de minimum 3 expériences différentes. La signification statistique de ces résultats est déterminée en utilisant le test « t » non paramétrique. Les valeurs de probabilité (P) inférieures à 0.05 (intervalle de confiance de 95%) sont considérées comme étant significatives.

III. RÉSULTATS

3.1. Présence et distribution des récepteurs à l'ET-1 dans les cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines.

Dans ces séries d'expériences, nous avons étudié la présence et la distribution des récepteurs à l'ET-1 dans les cellules endothéliales endocardiques (CEEs) fœtales humaines âgées de 20 semaines en utilisant les techniques d'immunofluorescence indirecte, d'immunobuvardage western ainsi que la microscopie confocale en 3-dimension (3-D).

3.1.1. Localisation et distribution du récepteur ET_A dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.

Au niveau vasculaire, il a été démontré que le muscle lisse vasculaire exprime majoritairement le récepteur ET_A (BIALECKI *et al.*, 1997). De plus, la présence de l'ARNm du récepteur ET_A a été observé au niveau de l'endothélium endocardique et du myocarde chez la souris (YANAGISAWA *et al.*, 2000). Plus récemment, des études menées par le groupe de BKAILY en 2003 ont démontré la présence du récepteur ET_A au niveau de la membrane plasmique et du cytosol des cellules cardiaques embryonnaires de poulet et du muscle lisse vasculaire humain. Nous avons donc voulu vérifier la présence et la distribution du récepteur ET_A dans les CEEs isolées du ventricule gauche (CEEGs) et du ventricule droit (CEEDs) des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour le récepteur

ET_A (dilution 1:100). Il est à noter que des contrôles négatifs sont effectués en parallèle en incubant les cellules avec l'anticorps primaire en présence d'une concentration élevée du peptide contrôle (75µg/ml) et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Le marquage est observé par la microscopie confocale qui nous permet de visualiser en trois dimensions la distribution du récepteur ET_A au niveau de nos cellules ainsi que d'évaluer d'une façon semi-quantitative l'intensité de fluorescence de l'antisérum du récepteur ET_A.

La figure 9 montre un exemple de l'image en 3-D (vue de haut) de la distribution et la densité relative du récepteur ET_A d'une CEED et d'une CEEG. Le récepteur ET_A semble être distribué de façon homogène avec une intensité de fluorescence comparable au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. Par la suite, et à l'aide du programme de mesure "Image Space" de "Molecular Dynamics", nous avons mesuré semi-quantitativement l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur ET_A (conjugué à l'Alexa Fluor 488) au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs. Les valeurs d'intensités de fluorescence au niveau des deux compartiments cellulaires sont calculées à partir de la distribution tridimensionnelle du récepteur ET_A dans nos cellules (voir figure 10). Comme on peut le voir dans cette figure, nos analyses statistiques des mesures semi-quantitatives montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans la densité du récepteur ET_A au niveau du cytosol et du noyau des CEEDs et des CEEGs. De plus, il n'y a pas de

Figure 9 Marquage immunofluorescent du récepteur ET_A dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEED (A) et d'une CEEG (B) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines montrant l'immunoréactivité du récepteur ET_A. (E) contrôle négatif (CN) effectué en incubant les cellules avec le peptide contrôle fourni par la compagnie (dilution 75µg/ml) en présence de l'anticorps primaire. Les panneaux C, D et F représentent le marquage du noyau en utilisant la sonde des acides nucléiques, le syto-11, des cellules dans les panneaux A, B et E, respectivement. Ce récepteur est présent d'une façon homogène au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur ET_A allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en µm. A,B et E sont trois cellules différentes de 3 expériences indépendantes.

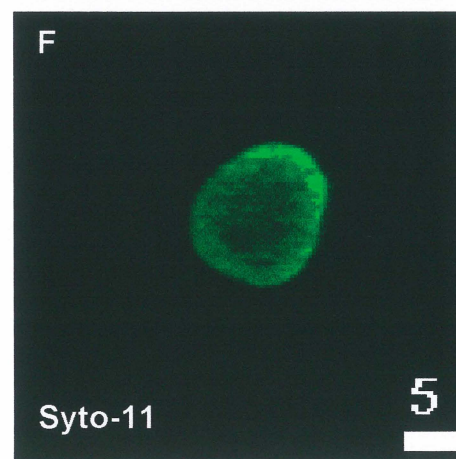
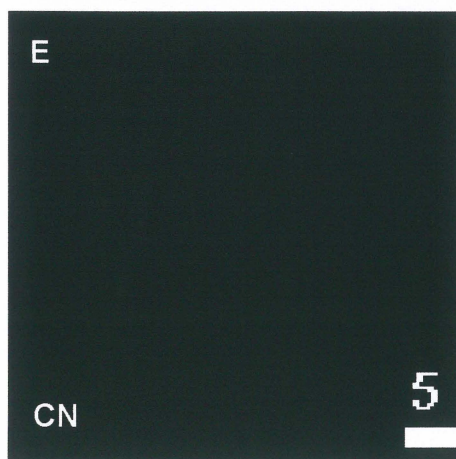
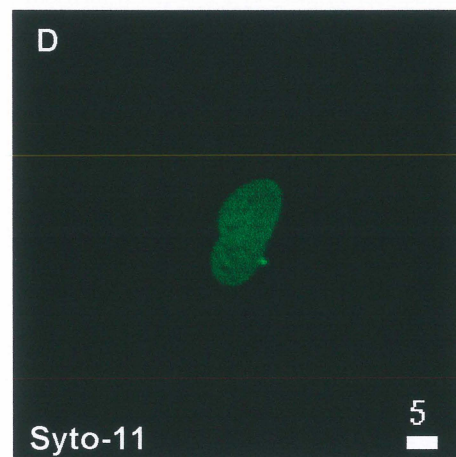
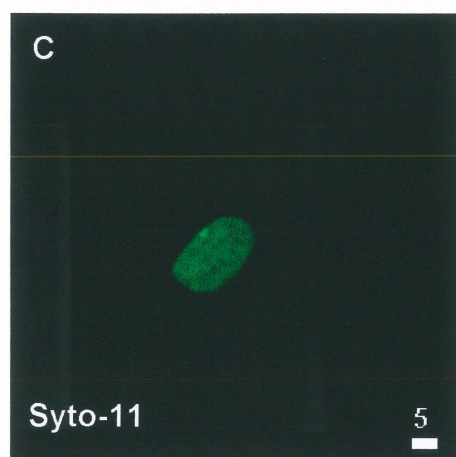
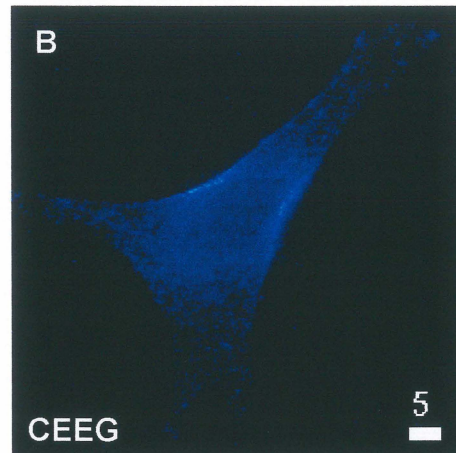
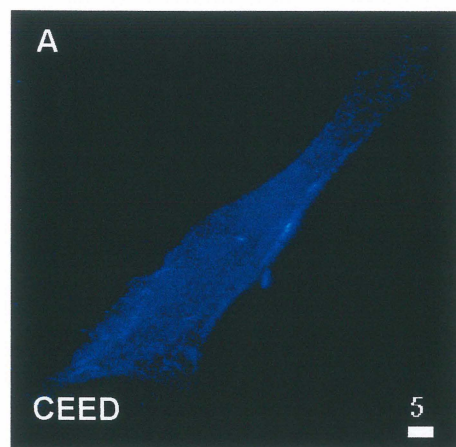
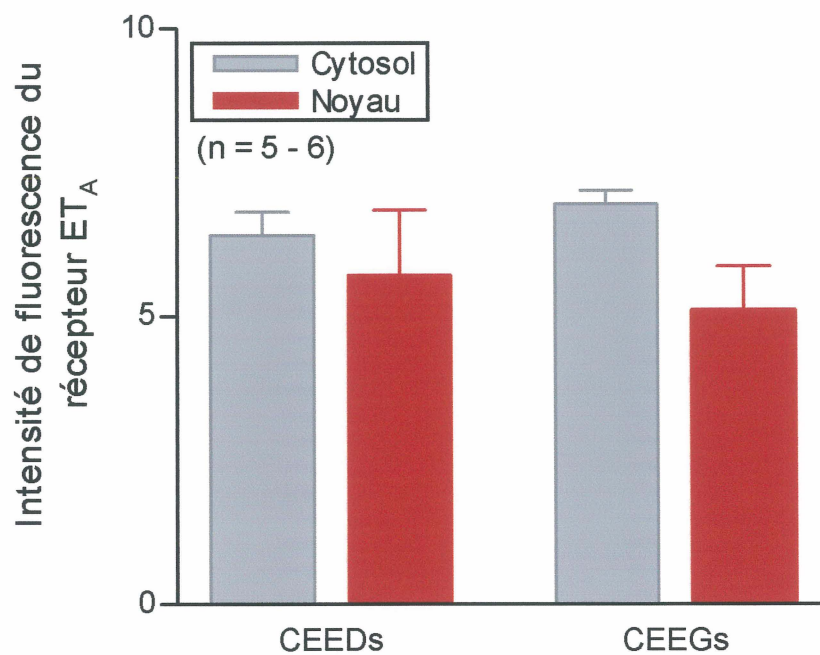


Figure 10 Densité relative du récepteur ET_A au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Cet histogramme montre la densité du récepteur ET_A dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. «n» est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes.

Densité relative du récepteur ET_A au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.



différence significative dans la densité du récepteur ET_A au niveau du cytosol et du noyau des CEEDs par rapport aux CEEGs. Pour les CEEDs, la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'Alexa Fluor conjugué à l'anticorps du récepteur ET_A est de 6.41 ± 0.41 dans le cytosol et de 5.72 ± 1.14 dans le noyau (n=6). Pour les CEEGs, la moyenne de l'intensité de fluorescence est de 6.96 ± 0.24 dans le cytosol et de 5.12 ± 0.76 dans le noyau (n=5).

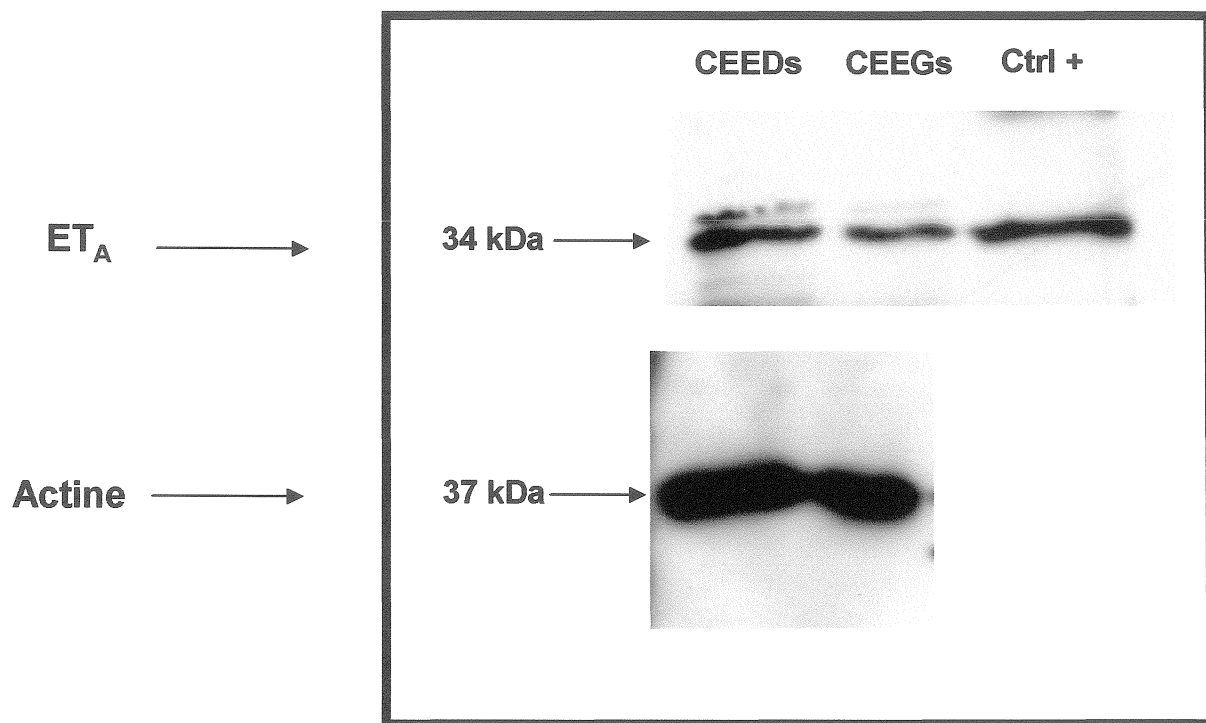
Dans une deuxième série d'expériences, pour démontrer l'expression du récepteur ET_A, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage western. Nous avons extrait, puis dosé les protéines totales des CEEDs et des CEEGs une fois à confluence en culture. 50 µg de protéines de ces cellules ont été séparé sur un gel de SDS-PAGE (10%) et par la suite analysé par immunobuvardage avec le même anticorps ET_A (dilution 1: 100) que celui qui a été utilisé pour les expériences d'immunofluorescence. Comme on peut le voir dans la figure 11, l'analyse de la bande de ~ 34 kDa correspondant aux récepteurs ET_A montre la présence de ce dernier au niveau des CEEDs et des CEEGs.

3.1.2. Localisation et distribution du récepteur ET_B dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.

Il est bien connu que le récepteur ET_B est localisé au niveau des cellules endothéliales vasculaires (De NUCCI *et al.*, 1988). D'autres études ont montré la

Figure 11 Présence du récepteur ET_A dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains agés de 20 semaines.

Autoradiographie montrant les protéines totales des CEEDs et des CEEGs analysées par immunobuvardage avec l'anticorps ET_A (1/100). L'analyse de la bande de ~ 34 kDa correspondante au récepteur ET_A montre la présence de ce type de récepteur au niveau des CEEDs et des CEEGs. Le contrôle positif est un lysat total de cellule A549. La membrane fut « stripée » puis incubée avec l'anticorps dirigé contre l'actine comme contrôle de protéine.



présence du récepteur ET_B au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire humain (BKAILY *et al.*, 2003). Nous donc avons voulu vérifier la présence et la distribution du récepteur ET_B dans les CEEDs et les CEEGs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour le récepteur ET_B (dilution 1/100). Des contrôles négatifs sont effectués en parallèle en préincubant l'anticorps primaire avec une concentration élevée du peptide contrôle (dilution 75 µg/ml). Le marquage est visualisé à l'aide de la microscopie confocale qui nous permet de déterminer en 3-D la distribution du récepteur ET_B au niveau de nos cellules ainsi que de mesurer d'une façon semi-quantitative l'intensité de fluorescence de l'anticorps ET_B (couplé à l'Alexa Fluor 488). La figure 12 montre un exemple de l'image en 3-D (vue de haut) de la distribution et la densité du récepteur ET_B d'une CEED et d'une CEEG. Le récepteur ET_B est présent au niveau de la membrane plasmique et du cytosol avec une immunoréactivité bien marquée au niveau du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. Les valeurs d'intensité de fluorescence au niveau des deux compartiments cellulaires sont calculées à partir de la distribution tridimensionnelle du récepteur ET_B dans nos cellules. La figure 13 résume nos résultats. Nos mesures semi-quantitatives montrent une différence dans la densité du récepteur ET_B dans les deux compartiments cellulaires (cytosol et noyau), aussi bien au niveau des CEEDs que des CEEGs (figure 13). Pour les CEEDs, la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'Alexa Fluor 488 conjugué à l'anticorps du récepteur ET_B est de 7.67 ± 0.90 dans le cytosol et de 23.78 ± 1.49 dans le noyau (n=11). Nos études statistiques montrent que la différence est

Figure 12 Marquage immunofluorescent du récepteur ET_B dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEED (A) et d'une CEEG (B) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines montrant l'immunoréactivité du récepteur ET_B. (E) contrôle négatif (CN) effectué en incubant les cellules avec le peptide contrôle fourni par la compagnie (dilution 75 µg/ml) en présence de l'anticorps primaire. Les panneaux C, D et F montrent le marquage du noyau en utilisant la sonde des acides nucléiques, le syto-11, des cellules dans les panneaux A, B et E, respectivement. Ce récepteur est présent au niveau de la membrane plasmique et du cytosol avec une intensité de fluorescence plus élevée au niveau du noyau et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur ET_B allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en µm. A, B et E sont trois cellules différentes de 3 expériences indépendantes.

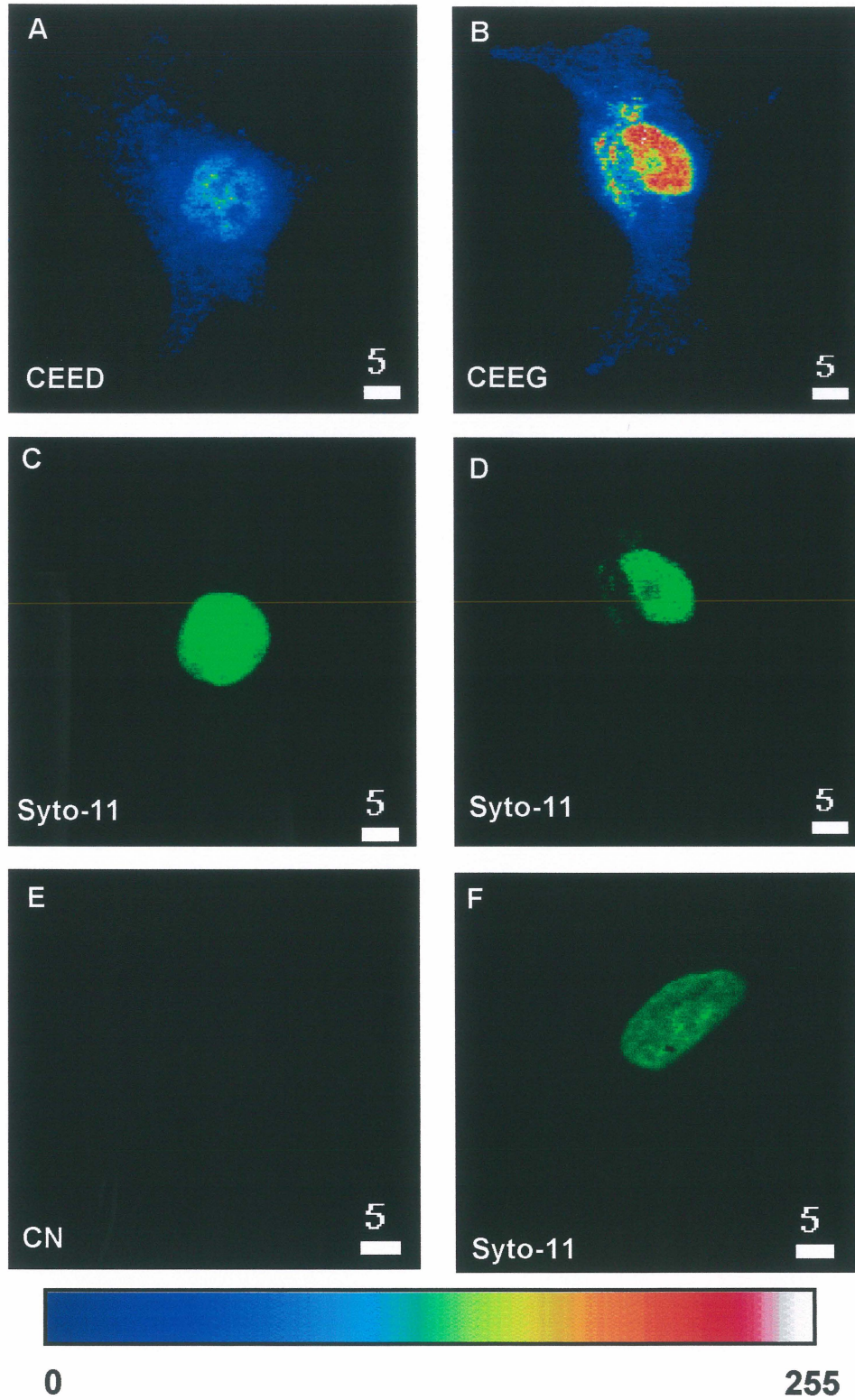
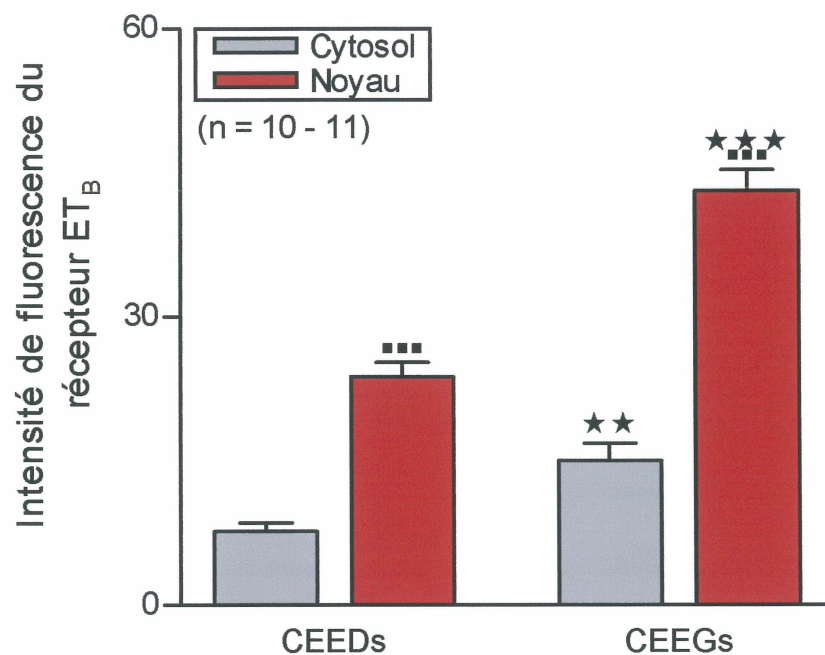


Figure 13 Densité relative du récepteur ET_B dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Cet histogramme montre la densité du récepteur ET_B dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. (■) Comparaison noyau vs cytosol au niveau des CEEDs et des CEEGs (■■■ $p < 0.001$ pour les deux types cellulaires). (★) Comparaison cytosol et noyau des CEEGs vs CEEDs (★★ $p < 0.01$ pour le cytosol et ★★★ $p < 0.001$ pour le noyau). «n» est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes pour les CEEDs et les CEEGs.

Densité relative du récepteur ET_B au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

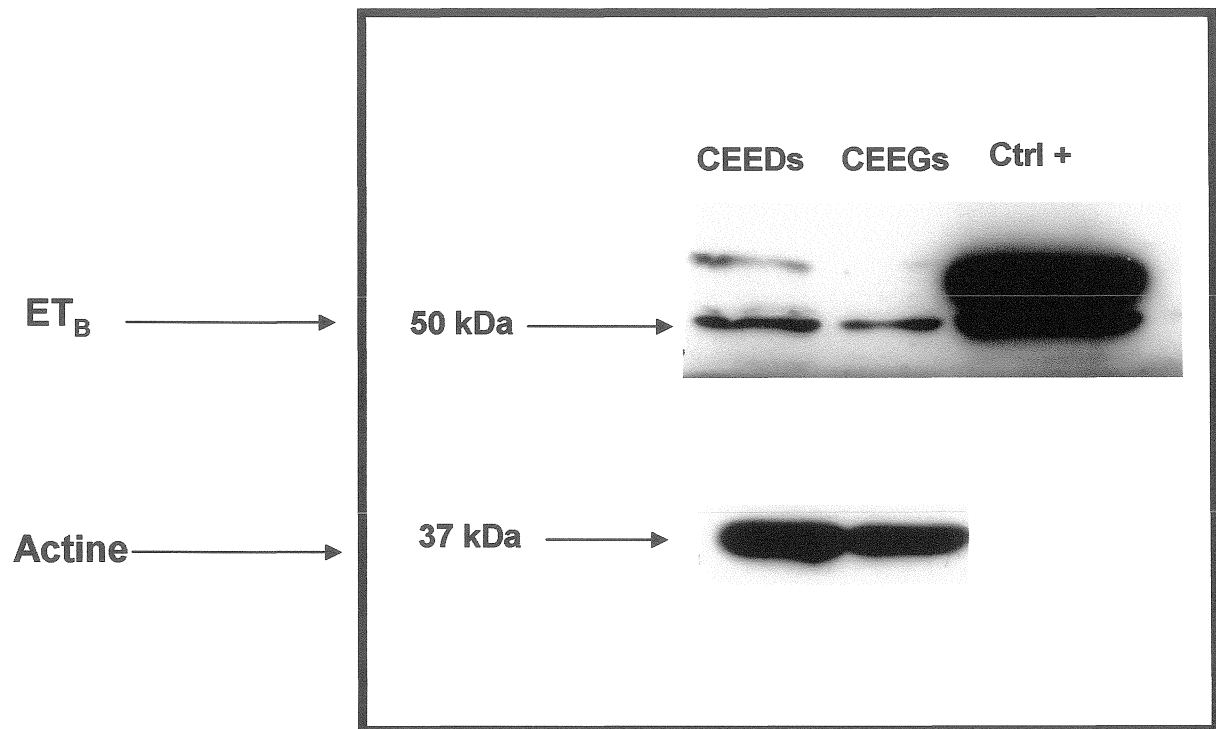


hautement significative ($p < 0.001$) entre le cytosol et le noyau de ces cellules. Pour les CEEGs, la moyenne de l'intensité de fluorescence est de 15.03 ± 1.80 dans le cytosol et de 43.18 ± 2.13 dans le noyau ($n=10$). Nos études statistiques suggèrent également que la différence est hautement significative ($p < 0.001$) entre le cytosol et le noyau de ces cellules (figure 13). De plus, nos résultats suggèrent aussi que la densité du récepteur ET_B est significativement plus élevée dans le cytosol et le noyau au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs ($p < 0.01$ pour le cytosol et $p < 0.001$ pour le noyau).

Dans une deuxième série d'expériences et comme pour le récepteur ET_A , nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage western pour confirmer les résultats que nous avons obtenus en immunofluorescence indirecte. Suite à l'extraction et au dosage des protéines totales des CEEDs et des CEEGs, 50 μ g de protéines ont été séparés sur un gel de SDS-PAGE (10%) et analysés par immunobuvardage avec le même anticorps ET_B (dilution 1/100) que celui utilisé pour les expériences d'immunofluorescence. Comme on peut le voir dans la figure 14, l'analyse de la bande de ~ 50 kD correspondant au récepteur ET_B montre la présence de ce dernier au niveau des CEEDs et des CEEGs. La nature de la bande au-dessus de 50 KDa est inconnue. Il s'agit peut-être du récepteur ET_B glycosilé ou le produit d'épissage alternatif de ce récepteur. Ces possibilités restent à être vérifiées.

Figure 14 Présence du récepteur ET_B dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Autoradiographie montrant les protéines totales des CEEDs et des CEEGs analysées par immunobuvardage avec l'anticorps ET_B (1/100). L'analyse de la bande de ~ 50 kDa correspondant au récepteur ET_B montre la présence de ce type de récepteur au niveau des CEEDs et des CEEGs. Le contrôle positif est un lysat total de cellules A549. La membrane fut « stripée » et incubée avec l'anticorps dirigé contre l'actine comme contrôle de protéine.

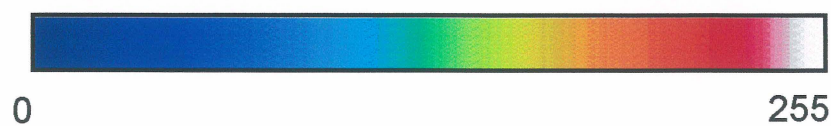
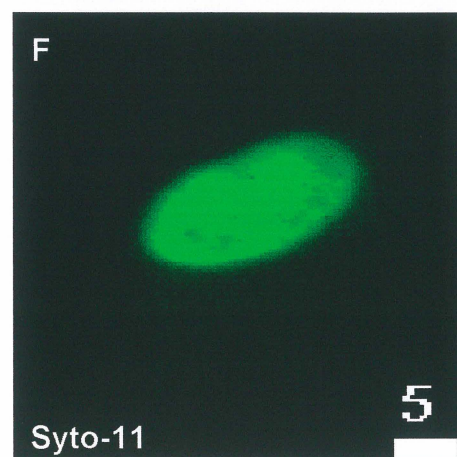
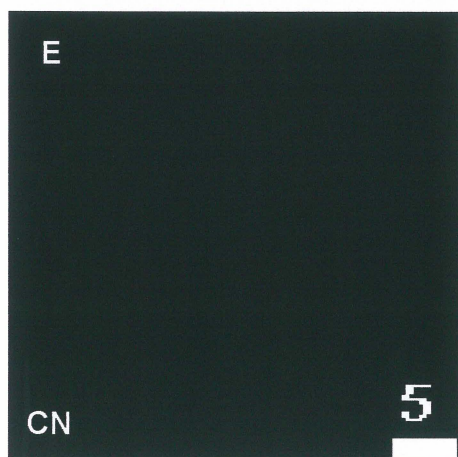
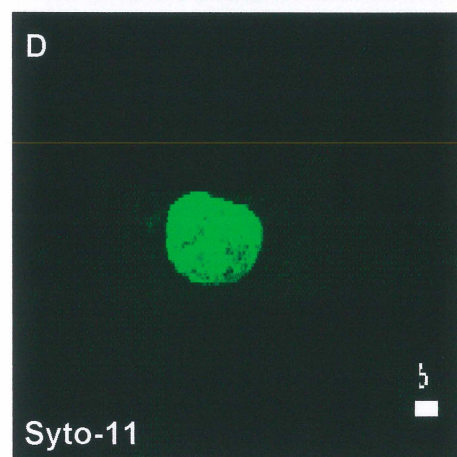
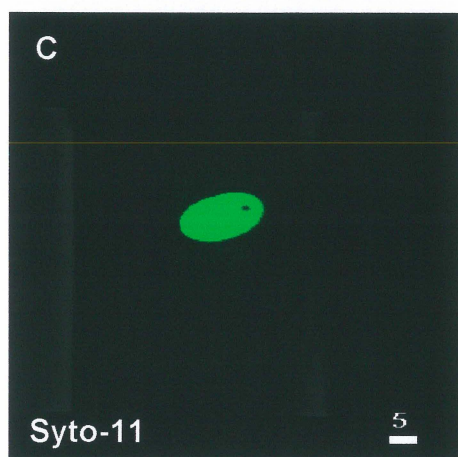
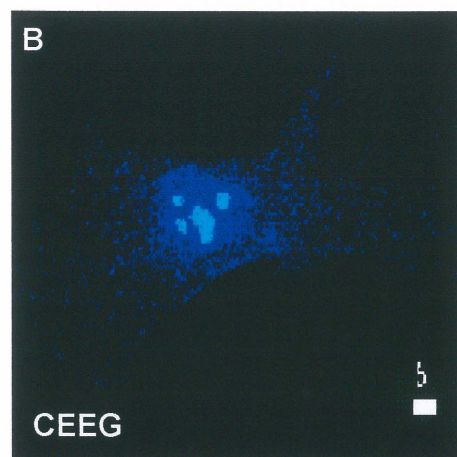
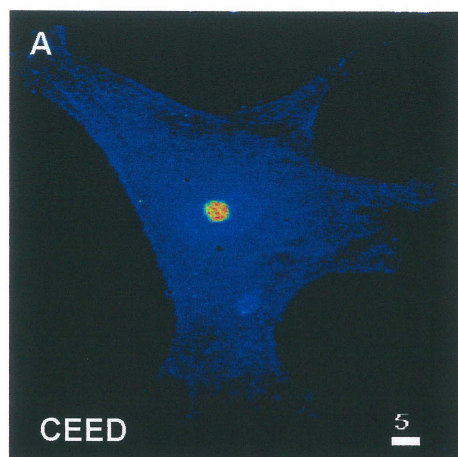


3.1.3. Localisation et distribution de l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Il est généralement connu que les cellules endothéliales vasculaires possèdent l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) qui permet de convertir la forme Big-ET-1 en ET-1 (KORTH *et al.*, 1999). Il a été également démontré que les CEEs possèdent l'enzyme de conversion ECE (BRUTSAERT, 2003). Dans cette série d'expérience, nous avons donc voulu vérifier si les CEEDs et les CEEGs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines contiennent de l'ET-1 en utilisant les techniques d'immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l'ET-1 (dilution 1/100). Des contrôles négatifs sont effectués en parallèle en préincubant l'anticorps primaire avec une concentration élevée du peptide contrôle (10^{-5} M). Le marquage est visualisé à l'aide de la microscopie confocale qui nous permet de déterminer en 3-D la distribution de l'ET-1 au niveau de nos cellules ainsi que de mesurer d'une façon semi-quantitative l'intensité de fluorescence de l'anticorps ET-1 (couplé à l'Alexa Fluor 488). La figure 15 montre un exemple de l'image en 3-D (vue de haut) de la distribution et la densité de l'ET-1 d'une CEED et d'une CEEG. Bien que le marquage au niveau du cytosol est faible d'une façon apparente (due à la faible intensité et à l'impression sur papier), l'ET-1 est présent au niveau de la membrane plasmique, le cytosol et plus particulièrement du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaires) et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. Les valeurs d'intensité de fluorescence au niveau des deux compartiments cellulaires sont calculées à partir de la distribution tridimensionnelle de l'ET-1 dans nos cellules. Nos mesures semi-

Figure 15 Marquage immunofluorescent de l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEED (A) et d'une CEEG (B) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines montrant l'immunoréactivité de l'ET-1. (E) contrôle négatif (CN) effectué en incubant les cellules avec le peptide contrôle (10^{-5} M) en présence de l'anticorps primaire. Les panneaux C, D et F représentent le marquage du noyau des cellules des panneaux A, B et E, respectivement, en utilisant la sonde des acides nucléiques, le syto-11. L'ET-1 est présent d'une façon hétérogène au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et ceci dans les CEEDs et dans les CEEGs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps de l'ET-1 allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm . A, B et E sont trois cellules différentes de 3 expériences indépendantes.



quantitatives montrent une différence significative dans la densité de l'ET-1 au niveau du cytosol et du noyau, et ce, aussi bien au niveau des CEEDs que des CEEGs (figure 16). Pour les CEEDs, la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'Alexa Fluor 488 conjugué à l'anticorps de ET-1 est de 4.12 ± 0.43 dans le cytosol et de 16.69 ± 0.98 dans le noyau (n=12). Nos études statistiques montrent que la différence est hautement significative ($p < 0.001$) entre le cytosol et le noyau de ces cellules. Pour les CEEGs, la moyenne de l'intensité de fluorescence est de 2.66 ± 0.29 dans le cytosol et de 7.19 ± 1.02 dans le noyau (n=7). Nos études statistiques montrent également que la différence est très significative ($p < 0.01$) entre le cytosol et le noyau (figure 16). De plus, nos résultats montrent aussi que la densité de l'ET-1 est significativement plus élevée dans le cytosol et le noyau au niveau des CEEDs par rapport aux CEEGs ($p < 0.05$ et $p < 0.001$, respectivement).

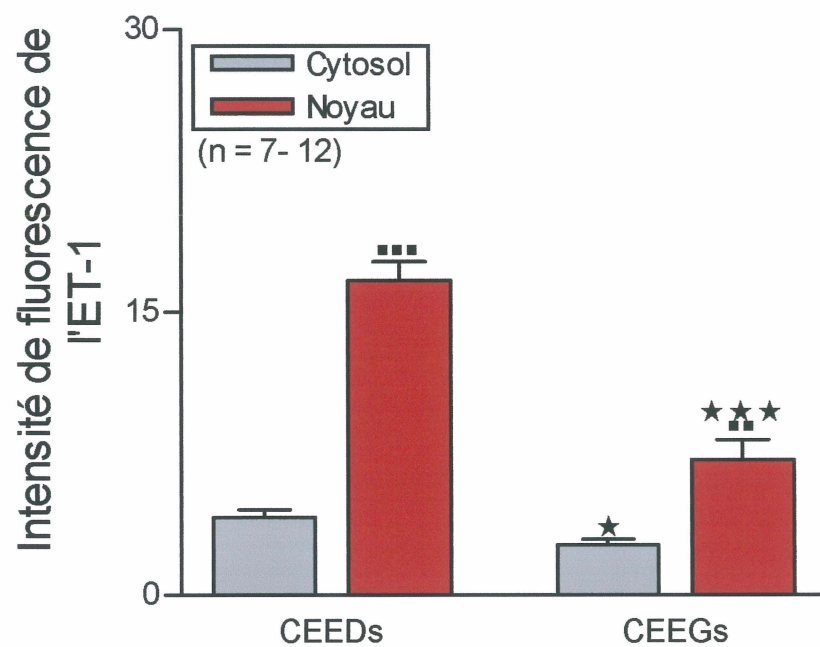
3.2. Effet d'une concentration physiologique d'ET-1 sur le niveau basal du $[Ca]_i$ des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines âgées de 20 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si l'ajout d'une concentration physiologique d'ET-1 extracellulaire module le niveau basal du calcium intracellulaire des cellules endothéliales endocardiques isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Figure 16 Densité relative de l'ET-1 au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Cet histogramme montre la densité de l'ET-1 dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. (■) comparaison noyau vs cytosol au niveau des CEEDs et des CEEGs (■■■ $p < 0.001$ et ■■ $p < 0.01$ respectivement). (★) Comparaison noyau et cytosol des CEEGs vs CEEDs (★★★ $p < 0.001$ et ★ $p < 0.05$, respectivement). «n» est le nombre de cellules de 4 expériences indépendantes pour les CEEDs et 3 pour les CEEGs.

Densité relative de l'ET-1 au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.



3.2.1. L'ET-1 extracellulaire augmente le niveau basal soutenu du $[Ca]_i$ des CEEDs et des CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.

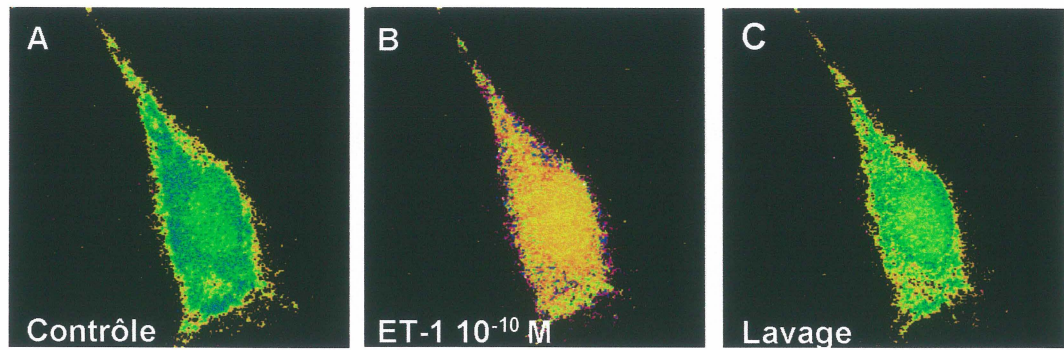
Dans cette série d'expériences, nous avons étudié l'effet d'une concentration physiologique d'ET-1 extracellulaire (10^{-10} M) sur le niveau calcique basal soutenu intracellulaire des CEEDs et des CEEGs isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en utilisant le système d'imagerie en 2-dimension (2-D) et une sonde calcique ratiométrique le fura-2. Il est à noter que l'intensité de fluorescence du ratio fura-2 liée au Ca^{2+} versus le fura-2 non liée au Ca^{2+} est indiquée selon une échelle de pseudocouleur représentant la concentration du $[Ca]_i$, où la couleur bleue représente la concentration minimale du $[Ca]_i$ i.e 3.40 nM, alors que la couleur mauve représente la concentration maximale du $[Ca]_i$ i.e 3246 nM. La mesure de la $[Ca]_i$ se fait toujours lorsque l'effet de la drogue sur les niveaux de $[Ca]_i$ atteint un état d'équilibre.

Après avoir enregistré le $[Ca]_i$ des cellules au niveau contrôle, nous avons tout d'abord stimulé les cellules avec l'ET-1 (10^{-10} M). La figure 17 montre un exemple typique du niveau de $[Ca]_i$ au niveau des CEEDs et des CEEGs. La figure 18 montre la compilation des mesures d'intensité de fluorescence du $[Ca]_i$ correspondantes. Comme le montre les figures 17 et 18, l'ET-1 induit une augmentation significative du $[Ca]_i$ des CEEDs (373.33 ± 85.53 ; $p < 0.05$; $n=3$) et des CEEGs (309.00 ± 36.30 ; $p < 0.01$; $n=3$) par rapport au contrôle (CEEDs : 102.34 ± 11.34 nM; $n=3$; CEEGs : 105.87 ± 17.10 nM; $n=3$). Suite au lavage de l'ET-1 du milieu extracellulaire, le niveau de $[Ca]_i$

Figure 17 Expérience représentative de l'effet d'une concentration physiologique (10^{-10}M) d'ET-1 sur le niveau du $[\text{Ca}]_i$ des CEEDs et des CEEGs isolées du coeur fœtal humain âgé de 20 semaines étudié en utilisant le système d'imagerie en 2-D et la sonde ratiométrique fura-2.

Niveau de $[\text{Ca}]_i$ en absence d'ET-1 (A et D) et en présence d'ET-1 (10^{-10}M) (B et E) d'une CEED (A et B) et d'une CEEG (D et E) isolées du coeur fœtal humain âgé de 20 semaines. Il est à noter que l'ajout de l'ET-1 (10^{-10}M) induit une augmentation significative du niveau du $[\text{Ca}]_i$ de la CEED et de la CEEG. (C et F) Le lavage de l'ET-1 du milieu extracellulaire ramène le niveau du $[\text{Ca}]_i$ au niveau contrôle. L'échelle de couleur représente la concentration du $[\text{Ca}]_i$ en nM allant de 3.40 nM à 3246nM. A et D sont deux cellules différentes de 2 expériences indépendantes.

CEED



CEEG

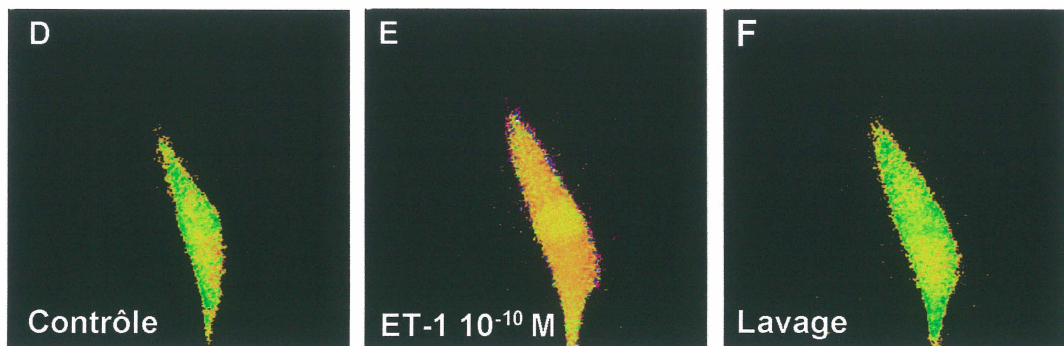
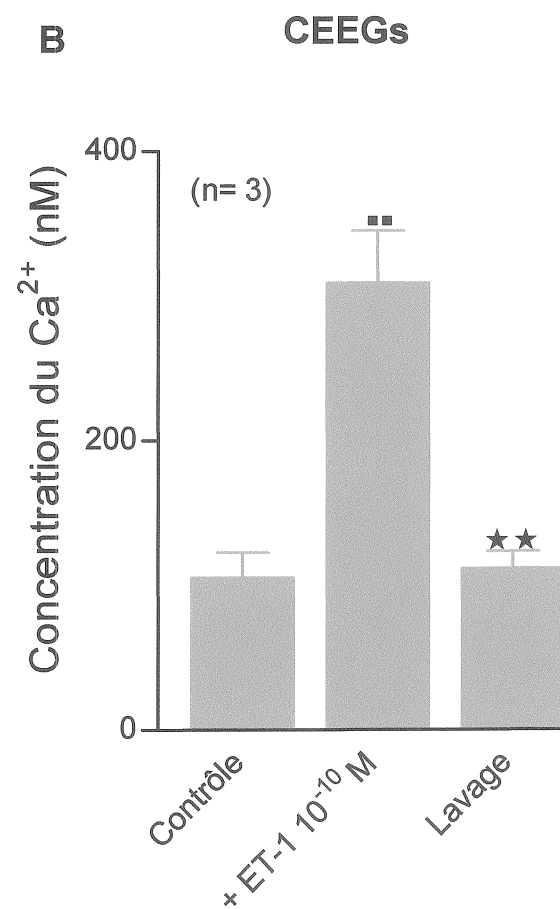
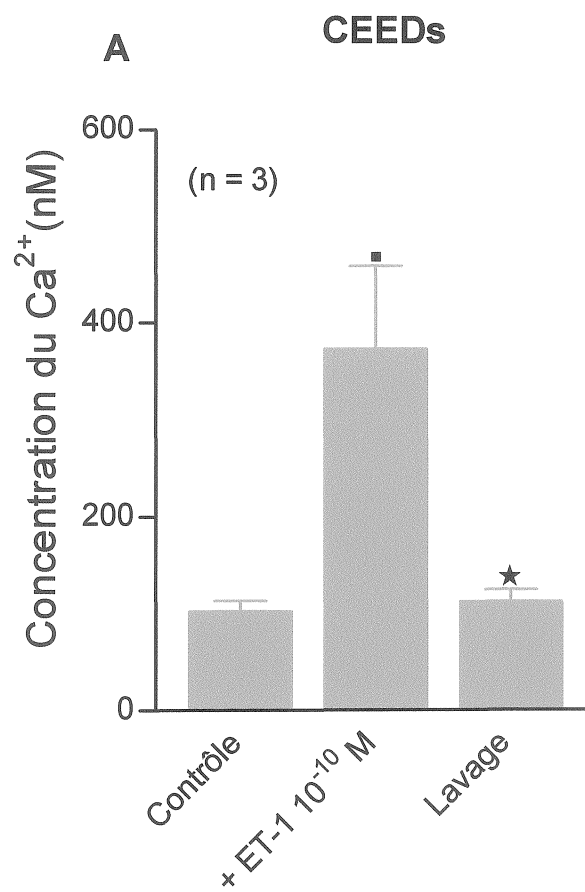


Figure 18 Effet d'une concentration physiologique d'ET-1 (10^{-10} M) sur le niveau du $[Ca]_i$ des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Cet histogramme représente la mesure de l'intensité de fluorescence du $[Ca]_i$ des CEEDs (A) et des CEEGs (B) isolées du cœur fœtal humaine âgé de 20 semaines. L'ajout de l'ET-1 (10^{-10} M) induit une augmentation significative du $[Ca]_i$ par rapport à leur niveau basal. Le lavage de l'ET-1 du milieu extracellulaire ramène les niveaux du $[Ca^{2+}]_i$ au niveau des valeur contrôles. Les valeurs sont présentées comme moyenne \pm erreur standard de la moyenne avec le nombre d'expériences indiquées entre parenthèses. (■ $p < 0.05$ et ■■ $p < 0.01$, par rapport au contrôle; ★ $p < 0.05$ et ★★ $p < 0.01$ par rapport à l'effet de l'ET-1). «n» est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes pour les CEEDs et les CEEGs.

**Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur les niveaux du $[Ca]_i$ total dans les
CEEDs (A) et CEEGs (B) isolées du cœur fœtal humain âgé de
20 semaines**



retourne au niveau basal (CEEDs : 117.88 ± 10.27 ; $p < 0.05$; $n=4$; (CEEGs : 112.13 ± 11.73 ; $p < 0.01$; $n=3$).

Ces résultats suggèrent que les récepteur ET_A et/ou ET_B sont impliqués dans la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

3.3. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs ET_A (BQ123) et ET_B (BQ788), sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ induite par l'ET-1 (10^{-10} M) dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si l'augmentation soutenue de la $[Ca]_i$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs du cœur fœtal âgé de 20 semaines est relayée via l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B . La concentration d'ET-1 choisie pour effectuer ces expériences est de 10^{-10} M. Il est à noter que cette concentration est capable de produire une augmentation soutenue statistiquement significative mais non saturante du calcium intracellulaire.

En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et la microscopie confocale, nous avons démontré la présence du récepteur ET_A dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Afin d'étudier le rôle de ce

récepteur dans la réponse calcique induite par l'ET-1, nous avons utilisé le BQ123, un antagoniste spécifique du récepteur ET_A (IHARA *et al.*, 1992).

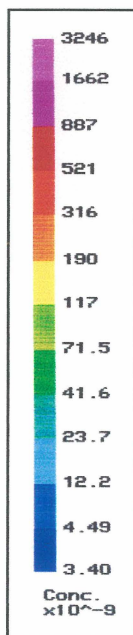
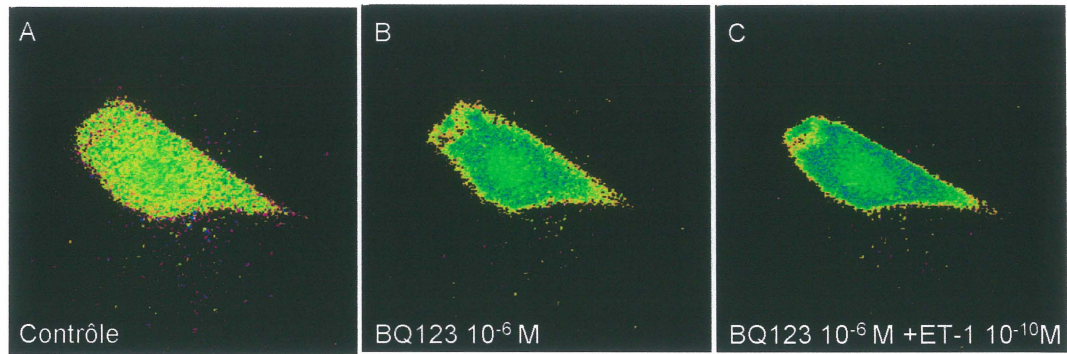
Dans cette série d'expériences, en utilisant l'imagerie en 2-D et la sonde calcique ratiométrique le fura-2, nous avons testé l'effet du prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec le BQ123 sur l'augmentation soutenue de la $[Ca]_i$ induite par l'ET-1. La figure 19 montre un exemple typique du niveau de $[Ca]_i$ des CEEDs (panneaux A, B et C) et des CEEGs (panneaux D, E et F) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les panneaux A et B de la figure 20 illustrent la moyenne des mesures des niveaux de la $[Ca]_i$ des CEEDs (n=3) (figure 20A) et des CEEGs (n=4) (figure 20B). Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10^{-6} M de BQ123, une concentration connue pour inhiber les effets de l'ET-1 médié par le récepteur ET_A (CHOUFANI, 2002). Pour les CEEDs et comme l'illustre la figure 20A, en condition contrôle, le niveau du $[Ca]_i$ est de 110.97 ± 10.44 ; n= 3 tandis que en présence du BQ123, le niveau de $[Ca]_i$ est de 87.10 ± 3.73 ; n=3. L'addition d'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M n'affecte pas le niveau du $[Ca]_i$ (83.77 ± 4.36 ; n=3). Pour les CEEGs, comme on peut le remarquer dans la figure 20B, en condition contrôle, le niveau du $[Ca]_i$ est de 91.92 ± 8.70 n=4 tandis qu'en présence de l'antagoniste, le niveau de $[Ca]_i$ est de 65.72 ± 8.70 (n=4).

L'addition subséquente de l'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M n'affecte pas le niveau de $[Ca]_i$ (51.90 ± 9.00 ; n=4). Ces résultats montrent que le BQ123, un antagoniste du récepteur ET_A est capable de prévenir complètement l'effet de l'ET-1

Figure 19 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A , le BQ123, sur l'augmentation soutenue du niveau de $[Ca]_i$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Les panneaux A et D représentent les niveaux de $[Ca]_i$ d'une CEED et une CEEG isolées de cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en milieu contrôle. (B et E) L'ajout de l'antagoniste du récepteur ET_A , le BQ123 (10^{-6} M), n'affecte pas le niveau du $[Ca]_i$ des CEEDs et CEEGs. (C et F) En présence du BQ123, l'addition de l'ET-1, à une concentration de 10^{-10} M, n'affecte pas le niveau du $[Ca]_i$ des CEEDs et des CEEGs. La représentation des images est indiquée selon une échelle de couleur représentant la concentration du $[Ca]_i$ en nM allant de 3.40 nM à 3246 nM. A et D sont deux cellules différentes de 2 expériences indépendantes.

CEED



CEEG

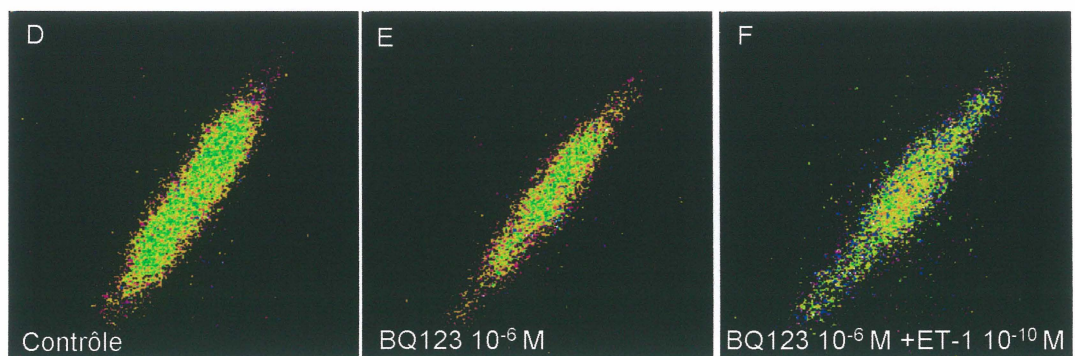
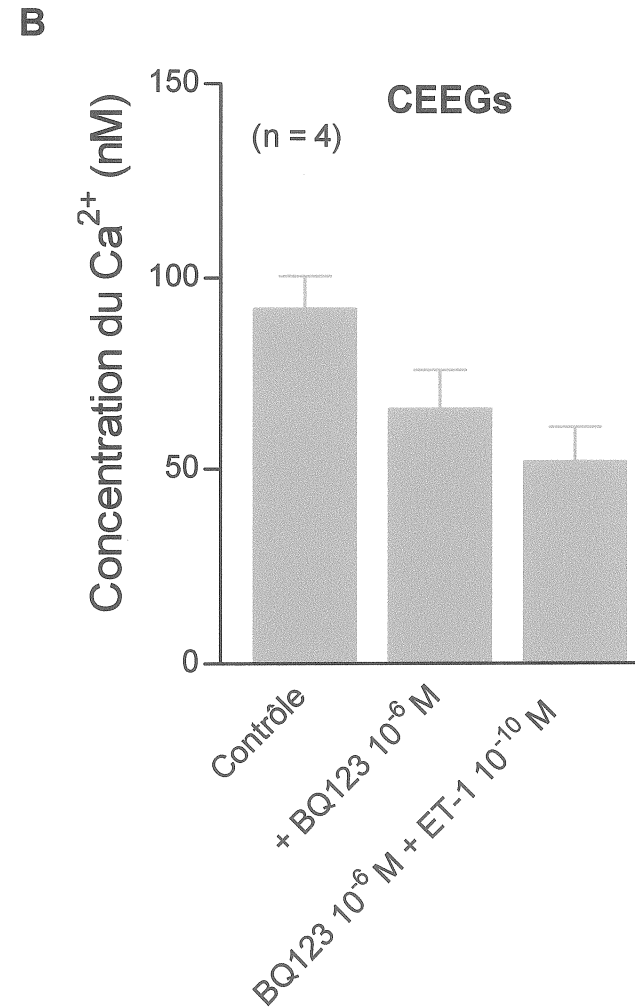
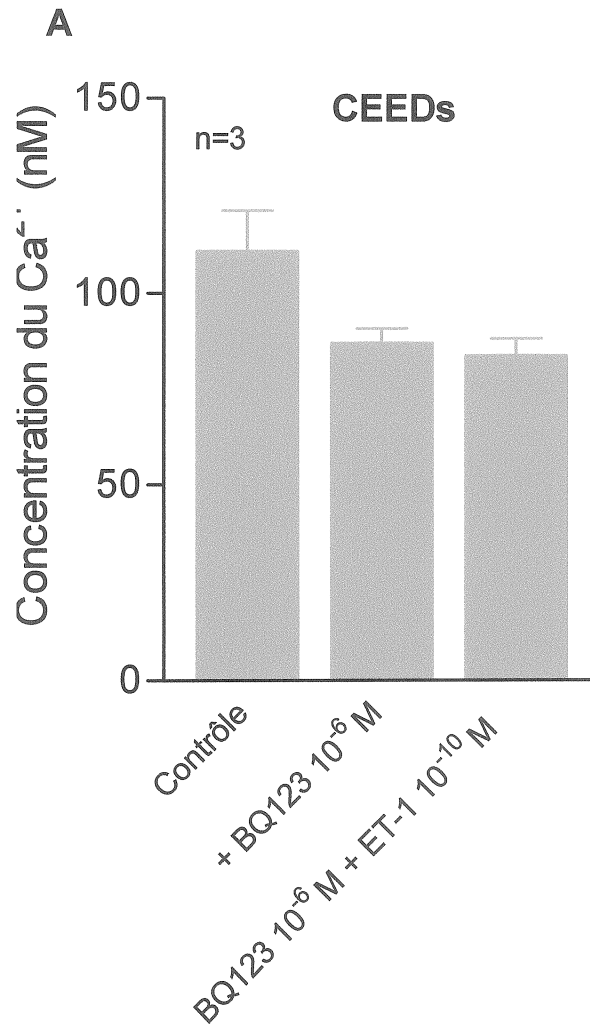


Figure 20 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ123, sur l'augmentation soutenue du [Ca]_i induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Ces histogrammes représentent la concentration du [Ca]_i des CEEDs (A) et des CEEGs (B) isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. En présence de l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ123, l'addition de l'ET-1 (10^{-10} M) n'induit pas une augmentation du [Ca]_i au niveau des CEEDs (A) et des CEEGs (B). Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. «n» est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes pour les CEEDs et de 4 pour les CEEGs.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ123, sur l'augmentation soutenue du [Ca]_i total induite par l'ET-1 dans les CEEDs (A) et les CEEGs (B) isolées de cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.



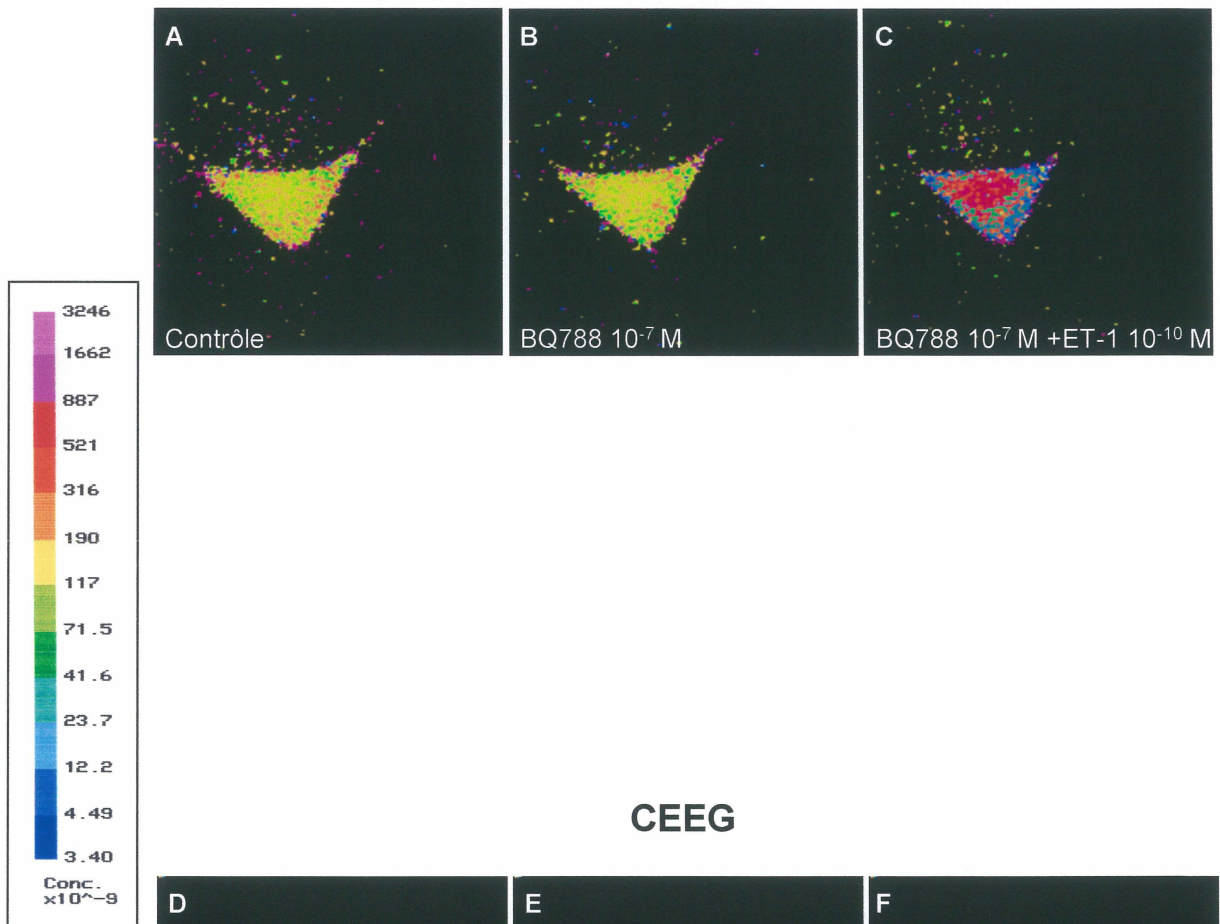
sur la réponse calcique intracellulaire des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines suggérant donc une implication du récepteur ET_A dans la réponse calcique induite par l'ET-1 au niveau de ces cellules.

En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et la microscopie confocale, nous avons déjà démontré la présence du récepteur ET_B dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Afin de vérifier si ce récepteur participe aussi à l'effet de l'ET-1 au niveau de ces cellules, nous avons utilisé le BQ788, un antagoniste spécifique du récepteur ET_B à une concentration de 10^{-7} M. En utilisant l'imagerie en 2-D et la sonde calcique ratiométrique le fura-2, nous avons testé l'effet du prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec le BQ788 sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ induite par l'ET-1. La figure 21 montre un exemple des niveaux de $[Ca]_i$ d'une CEED (panneaux A, B et C) et d'une CEEG (panneaux D, E et F) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10^{-7} M de BQ788. Comme l'illustre la figure 21, l'antagoniste des récepteurs ET_B , le BQ788, ne prévient pas l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ induite par l'ET-1 (10^{-10} M) au niveau des CEEDs (panneaux B et C). Par contre, au niveau des CEEGs (panneaux E et F), le BQ788, prévient l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ relayée par l'ET-1 (10^{-10} M). Les panneaux A et B de la figure 22 illustrent la moyenne des mesures des niveaux du $[Ca]_i$ des CEEDs (n=3) (figure 22A) et des CEEGs (n=5) (figure 22B). Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10^{-7} M de BQ788, une concentration connue pour bloquer le récepteur ET_B (CHOUFANI, 2002). Pour les CEEDs et comme

Figure 21 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B, le BQ788, sur l'augmentation soutenue du niveau de [Ca]_i induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Les panneaux A et D représentent les niveaux de [Ca]_i d'une CEED et d'une CEEG isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en milieu contrôle. (B et E) L'ajout de l'antagoniste du récepteur ET_B, le BQ788 (10^{-7} M), n'affecte pas le niveau du [Ca]_i des CEEDs et des CEEGs. (C et F) En présence du BQ788, l'addition de l'ET-1, à une concentration de 10^{-10} M, cause une augmentation du niveau du [Ca]_i au niveau des CEEDs, mais pas au niveau des CEEGs. La représentation des images est indiquée selon une échelle de couleur représentant la concentration du [Ca]_i en nM allant de 3.40 nM à 3246 nM. A et D sont deux cellules différentes de 2 expériences indépendantes.

CEED



CEEG

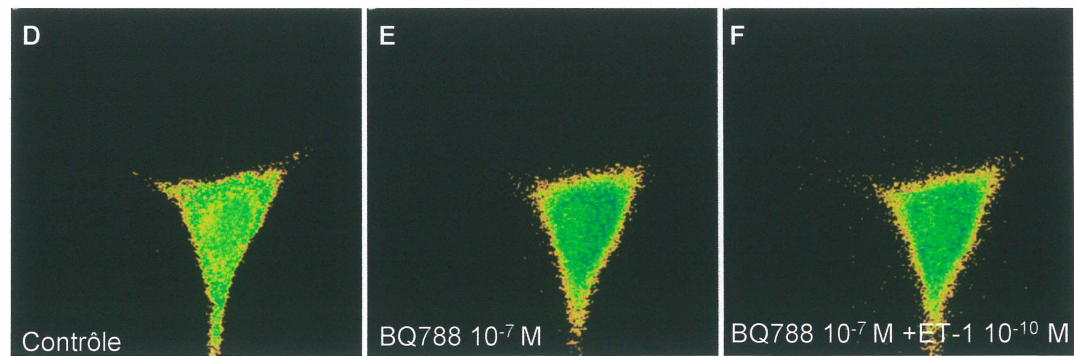
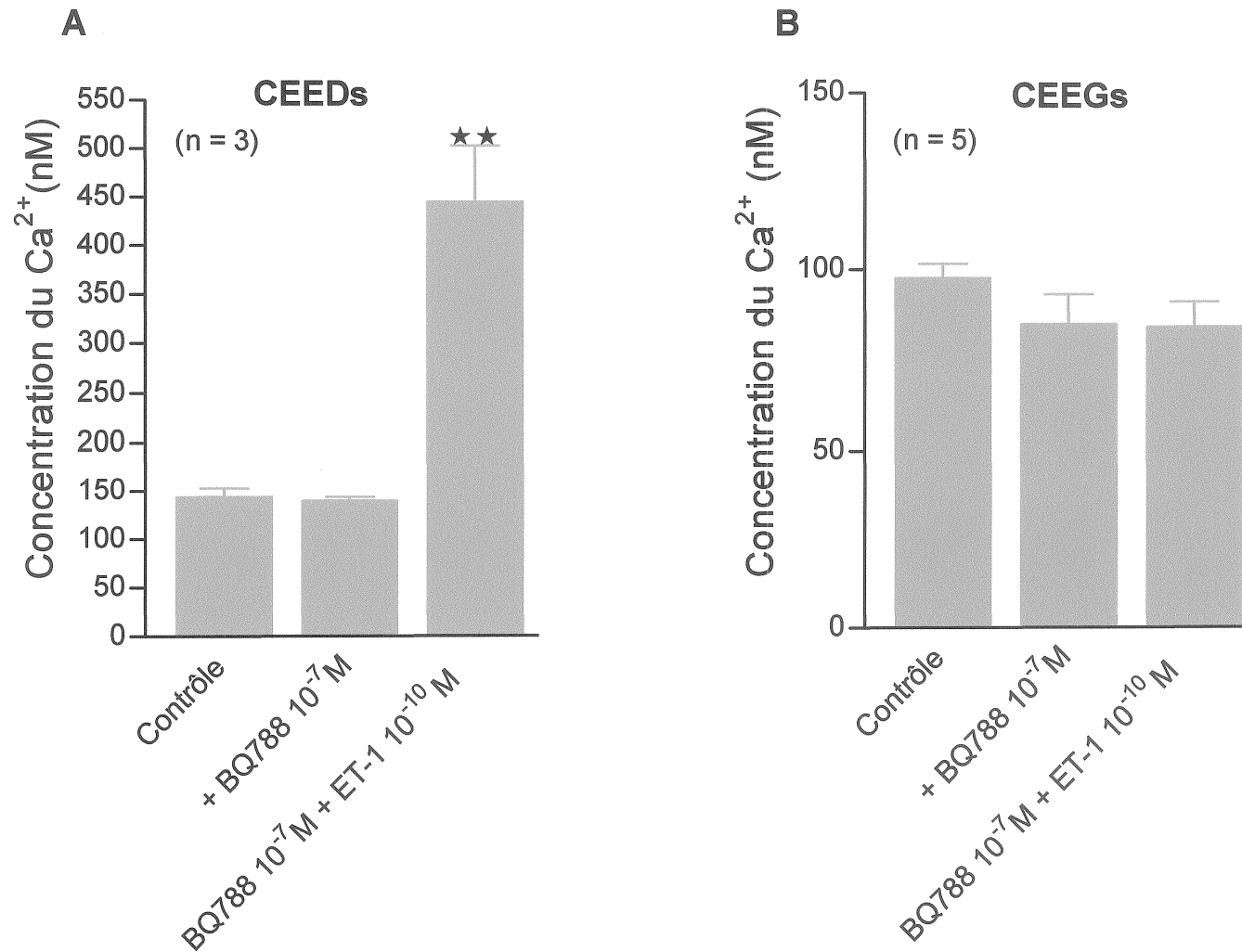


Figure 22 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B , le BQ788, sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.

Ces histogrammes représentent la concentration du $[Ca]_i$ des CEEDs (A) et des CEEGs (B) isolées du cœur foetal âgé de 20 semaines. En présence de l'antagoniste du récepteur ET_B , le BQ788, l'addition de l'ET-1 (10^{-10} M) induit une augmentation des niveaux du $[Ca]_i$ au niveau des CEEDs (A), mais pas au niveau des CEEGs (B). Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. ★ ★ $p < 0.01$ par rapport à l'effet du BQ788 (10^{-7} M). «n» est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes pour les CEEDs et pour les CEEGs.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B, le BQ788, sur l'augmentation soutenue du [Ca]_i total induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœur isolées fœtaux humains âgés de 20 semaines.



l'illustre la figure 22A, en condition contrôle, le niveau du $[Ca]_i$ est de 144.00 ± 9.50 nM (n=3). En présence du BQ788 (10^{-7} M), le niveau du $[Ca]_i$ est de 140.00 ± 4.00 nM (n=3). L'addition d'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M induit une augmentation très significative du niveau du $[Ca]_i$ (444.66 ± 57.78 nM; $p < 0.01$; n=3).

Pour les CEEGs, comme on peut le remarquer dans la figure 22B, en condition contrôle, le niveau de $[Ca]_i$ est de 97.64 ± 4.00 nM (n=5), tandis qu'en présence du BQ788 (10^{-7} M), le niveau de $[Ca]_i$ est de 84.84 ± 8.30 nM (n=5). L'addition subséquente de l'ET-1, à une concentration de 10^{-10} M, n'affecte pas le niveau de $[Ca]_i$ des cellules (84.04 ± 7.00 nM; n=5). Ces résultats montrent que le BQ788, un antagoniste du récepteur ET_B , est capable de prévenir complètement l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique intracellulaire des CEEGs, mais pas des CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Ces résultats suggèrent donc une implication du récepteur ET_B dans la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 au niveau des CEEGs mais pas au niveau des CEEDs.

3.4. Effet de différentes concentrations d'ET-1 sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines âgées de 20 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si l'ajout de concentration croissantes d'ET-1 extracellulaire module le niveau basal du calcium cytosolique

($[Ca]_c$) et du calcium nucléaire ($[Ca]_n$) des cellules endothéliales endocardiques isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

3.4.1. L'ET-1 extracellulaire augmente d'une façon dose-dépendante le niveau basal soutenu du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des CEEDs et des CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.

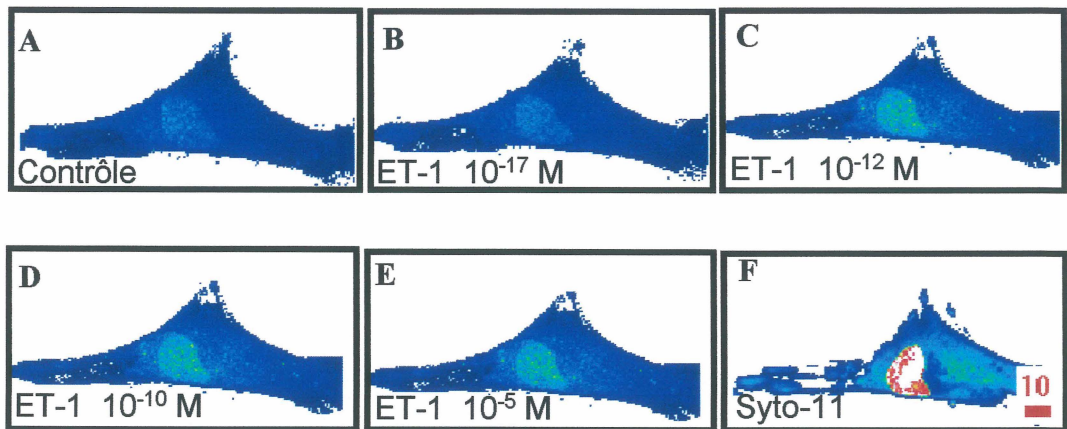
Dans cette série d'expériences, nous avons étudié l'effet de concentration croissante d'ET-1 extracellulaire (10^{-17} à 10^{-6} M) sur le niveau calcique basal soutenu cytosolique et nucléaire des CEEDs et des CEEGs isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en utilisant la microscopie confocale en 3-dimension (3-D) et une sonde calcique non-ratiométrique le fluo3. Il est à noter que l'enregistrement des niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ est fait après que chaque concentration d'ET-1 a atteint un effet soutenu.

La figure 23 montre un exemple de l'effet dose-dépendant de l'ET-1 sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une CEED (panneaux A à E) et d'une CEEG (panneaux G à K). Nous pouvons distinguer dans cette figure, la distribution calcique soutenue cytosolique et nucléaire au niveau contrôle et suite à la stimulation par l'ET-1 à des concentrations de 10^{-17} , 10^{-12} , 10^{-10} et 10^{-5} M. Au niveau contrôle et suite à l'ajout des différentes concentrations d'ET-1, le Ca^{2+} libre est plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. Il est à noter que l'intensité de fluorescence du complexe fluo-3/ Ca^{2+} est

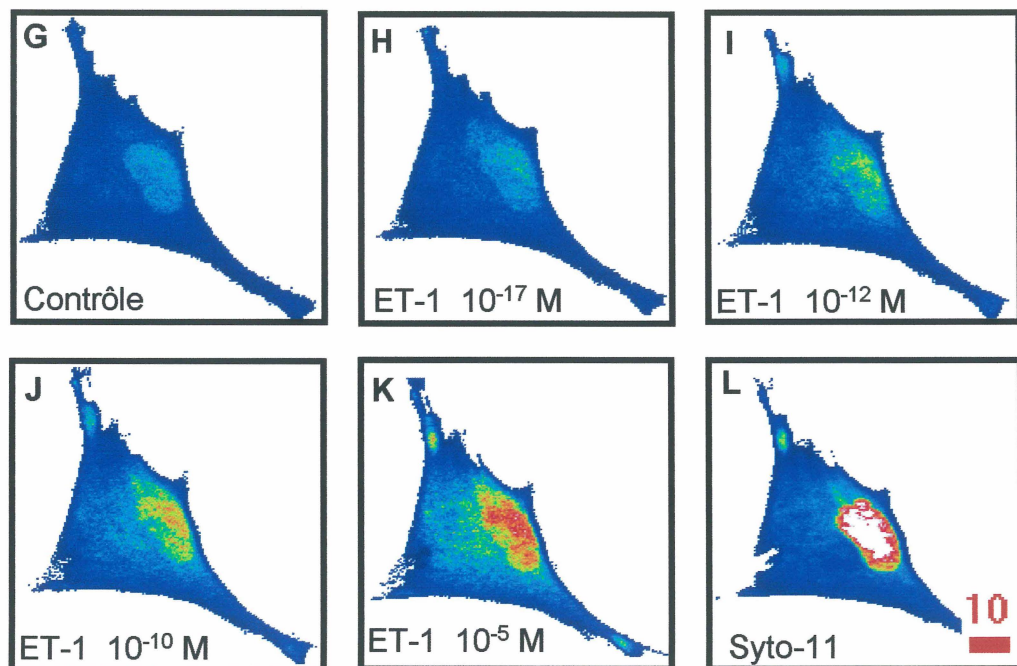
Figure 23 Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations d'ET-1 sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines étudié en microscopie confocale.

Distribution et intensité de fluorescence en 3-D (vue de haut) basale soutenue cytosolique et nucléaire du complexe fluo-3/ Ca^{2+} en absence d'ET-1 dans une CEED (A) et une CEEG (G) isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les panneaux B, C, D et E représentent la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire soutenue du complexe fluo-3/ Ca^{2+} d'une CEED en présence de différentes concentrations d'ET-1 i.e 10^{-17} , 10^{-12} , 10^{-10} et 10^{-5} M, respectivement. Les panneaux H, I, J et K représentent la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire soutenue du complexe fluo-3/ Ca^{2+} d'une CEEG en présence de différentes concentrations d'ET-1 i.e 10^{-17} , 10^{-12} , 10^{-10} et 10^{-5} M, respectivement. (F et L) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe fluo-3/ Ca^{2+} de 0 à 255. La couleur dans les panneaux F et L n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm . A et G sont deux cellules différentes de 2 expériences indépendantes.

CEED



CEEG



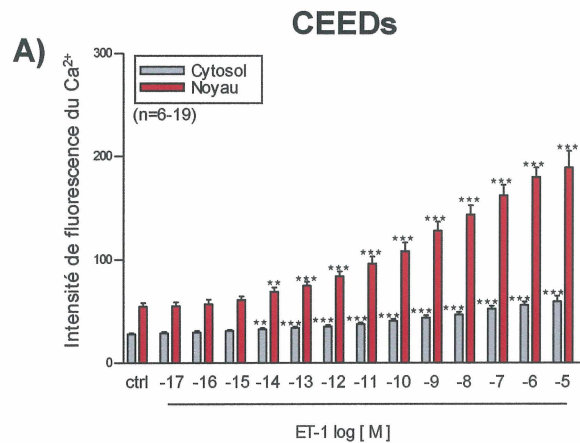
indiquée selon une échelle en pseudo-couleur, où la couleur noire représente l'intensité zéro de la concentration du Ca^{2+} , alors que la couleur blanche représente l'intensité maximale. À la fin de chaque expérience, le noyau des cellules est marqué par la sonde des acides nucléiques, le syto-11 (panneaux F et L), afin de déterminer l'attribution de la réponse calcique au niveau nucléaire. De plus, ce marquage permet par la suite d'analyser le niveau de calcium libre à l'intérieur du noyau. Il est à noter que les mesures d'intensité de fluorescence du complexe fluo-3/ Ca^{2+} sont obtenues grâce à l'analyse de la distribution tridimensionnelle effectuée à partir d'images optiques sériées générées par la microscopie confocale.

Les panneaux A et C de la figure 24 montrent la compilation des résultats obtenus en microscopie confocale de l'effet de l'ajout de doses croissantes d'ET-1 extracellulaire sur les niveaux calciques libres soutenus cytosolique et nucléaire dans les CEEDs (figure 24A) et les CEEGs (figure 24C) du cœur âgé de 20 semaines. Les figures 24 B et 24D montrent les courbes dose-réponse de l'effet de l'ET-1 sur le niveau du calcium soutenu cytosolique et nucléaire dans les CEEDs (figure 24B) et les CEEGs (figure 24D) isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. Comme nous pouvons le remarquer dans la figure 24A, le niveau du Ca^{2+} libre nucléaire basal ($[\text{Ca}]_n$) soutenu en absence d'ET-1 (54.65 ± 3.50 ; $n=19$) est supérieure à celle du calcium libre cytosolique ($[\text{Ca}]_c$) (27.53 ± 1.00 ; $n=19$). Il est à noter que cette différence est maintenue en présence de toutes les concentrations d'ET-1 utilisées. Des concentrations d'ET-1 de 10^{-17} M, 10^{-16} M et 10^{-15} M, n'affecte pas de façon significative les niveaux du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$ par rapport au contrôle. (cytosol 10^{-17} M:

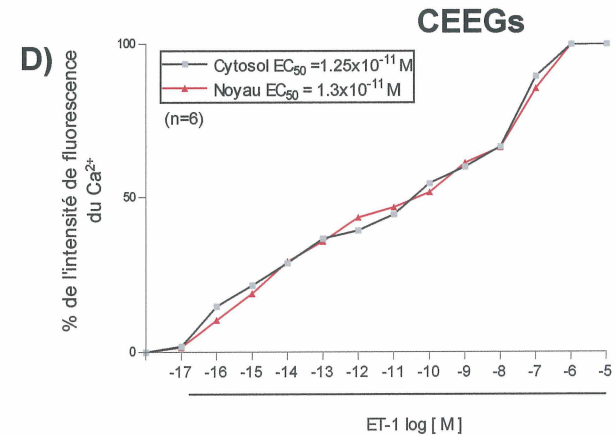
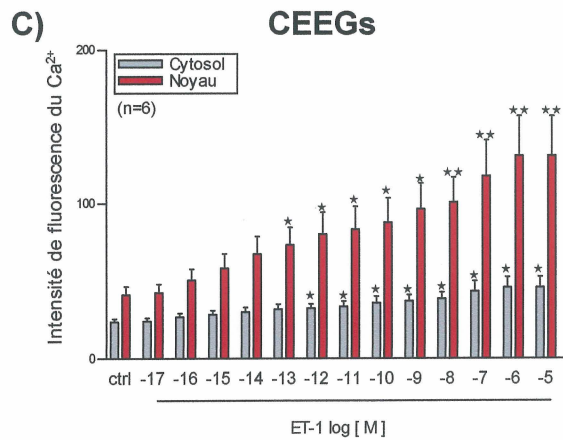
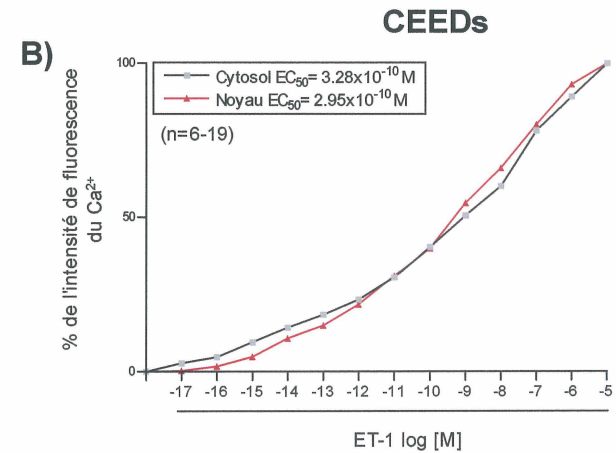
Figure 24 Effet de différentes concentrations d'ET-1 sur les niveaux soutenus du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Dans les panneaux A et B, l'ET-1 à des concentrations entre 10^{-17} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. (A) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_n$ et du $[Ca]_c$ est obtenue à une concentration de 10^{-14} M. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-5} M d'ET-1. (B) Les valeurs de EC_{50} sont de 3.28×10^{-10} M pour le cytosol et de 2.95×10^{-10} M pour le noyau. Dans les panneaux C et D, l'ET-1 à des concentrations entre 10^{-17} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. (C) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_n$ est obtenue à une concentration de 10^{-13} M. À partir d'une concentration de 10^{-12} M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-6} M d'ET-1. (D) Les valeurs de EC_{50} sont de 1.25×10^{-11} M pour le cytosol et de 1.3×10^{-11} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. ★ $p < 0.05$ ★★ $p < 0.01$ ★★★ $p < 0.001$. «n» est le nombre de cellules de 5 expériences indépendantes pour les CEEDs et de 3 pour les CEEGs. ctrl : contrôle

Effet de concentrations croissantes d'ET-1 sur le niveau soutenu du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEs (A) et CEEGs (C) isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.



Courbe dose-réponse de l'effet de l'ET-1 sur le niveau calcique soutenu des CEEs (B) et des CEEGs (D) isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.



28.43 ± 1.38 , noyau 10^{-17} M: 55.06 ± 3.80 ; $n=10$; cytosol 10^{-16} M: 29.30 ± 1.54 , noyau 10^{-16} M: 57.00 ± 4.30 ; $n=10$; cytosol 10^{-15} M: 30.55 ± 1.10 , noyau 10^{-15} M: 61.07 ± 3.24 ; $n=16$). Cependant une concentration de 10^{-14} M d'ET-1 induit une augmentation hautement significative du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ (cytosol 10^{-14} M: 32.04 ± 1.10 ; noyau 10^{-14} M: 69.00 ± 3.80 $p < 0.01$; $n=19$) et ce pour toutes les autres concentrations utilisées 10^{-13} M (cytosol 10^{-13} M: 33.39 ± 1.22 ; noyau 10^{-13} M: 74.60 ± 3.89 ; $p < 0.001$; $n=19$), 10^{-12} M (cytosol 10^{-12} M: 39.87 ± 1.33 ; noyau 10^{-12} M: 83.97 ± 4.60 ; $p < 0.001$; $n=19$), 10^{-11} M (cytosol 10^{-11} M: 37.26 ± 1.69 ; noyau 10^{-11} M: 96.33 ± 6.88 ; $p < 0.001$; $n=19$), 10^{-10} M (cytosol 10^{-10} M: 4.40 ± 2.04 ; noyau 10^{-10} M: 108.38 ± 8.25 ; $p < 0.001$; $n=19$), 10^{-9} M (cytosol 10^{-9} M: 43.66 ± 2.23 ; noyau 10^{-9} M: 128.17 ± 8.61 ; $p < 0.001$; $n=19$), 10^{-8} M (cytosol 10^{-8} M: 46.71 ± 2.35 ; noyau 10^{-8} M: 143.59 ± 9.15 ; $p < 0.001$; $n=19$), 10^{-7} M (cytosol 10^{-7} M: 52.43 ± 2.79 ; noyau 10^{-7} M: 162.48 ± 10.21 ; $p < 0.001$; $n=19$), 10^{-6} M (cytosol 10^{-6} M: 55.96 ± 3.10 ; noyau 10^{-6} M: 180.23 ± 9.03 ; $p < 0.001$; $n=19$). L'effet maximal au niveau cytosolique et nucléaire est observé à une concentration près de 10^{-5} M. À 10^{-5} M d'ET-1, le niveau du $[Ca]_c$ est de 59.44 ± 5.32 et du $[Ca]_n$ est de 189.47 ± 16.00 ; $p < 0.001$; $n=6$.

La figure 24 C montre l'effet de doses croissantes d'ET-1 sur les niveaux soutenus $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les niveaux de $[Ca]_n$ basaux soutenus en absence d'ET-1 (41.22 ± 5.10 ; $n=6$) est supérieure à celle du $[Ca]_c$ (23.95 ± 1.90 ; $n=6$). Cette différence est maintenue en présence de toutes les concentrations d'ET-1 utilisées. Des concentrations de 10^{-17} M, 10^{-16} M, 10^{-15} M et 10^{-14} M d'ET-1, n'affecte pas de façon significative les niveaux du

[Ca]_c et du [Ca]_n par rapport au contrôle (cytosol 10⁻¹⁷ M: 23.34 ± 2.10, noyau 10⁻¹⁷ M: 42.63 ± 5.30; cytosol 10⁻¹⁶ M: 27.16 ± 2.20, noyau 10⁻¹⁶ M: 50.50 ± 7.25; cytosol 10⁻¹⁵ M: 28.63 ± 2.50, noyau 10⁻¹⁵ M: 58.17 ± 9.30; cytosol 10⁻¹⁴ M: 30.22 ± 2.80, noyau 10⁻¹⁴ M: 67.43 ± 11.30; n=6). L'ET-1 à une concentration de 10⁻¹³ M induit une augmentation significative du [Ca]_n (73.30 ± 11.20; p<0.05) mais pas du [Ca]_c (31.94 ± 3.10); n=6. L'ajout d'ET-1 à une concentration de 10⁻¹² M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M et 10⁻⁹ M induit une augmentation significative du [Ca]_c et du [Ca]_n (cytosol 10⁻¹² M: 32.51 ± 2.70, noyau 10⁻¹² M: 80.30 ± 14.10; cytosol 10⁻¹¹ M: 33.64 ± 3.30, noyau 10⁻¹¹ M: 83.29 ± 14.80; cytosol 10⁻¹⁰ M: 35.90 ± 4.20, noyau 10⁻¹⁰ M: 87.74 ± 15.80; cytosol 10⁻⁹ M: 37.07 ± 4.00, noyau 10⁻⁹ M: 96.46 ± 16.90; p<0.05; n=6). À partir d'une concentration de 10⁻⁸ M, l'ET-1 induit une augmentation significative du [Ca]_c et très significative du [Ca]_n (cytosol 10⁻⁸ M: 38.50 ± 4.27; p<0.05, noyau 10⁻⁸ M: 100.93 ± 16.43, p<0.01; n=6), puis, à 10⁻⁷ M on observe la même chose (cytosol 10⁻⁷ M: 43.49 ± 6.37; noyau 10⁻⁷ M: 118.20 ± 23.25; p< 0.01; n=6). L'effet maximal est observé à une concentration de 10⁻⁶ M d'ET-1 où le niveau du [Ca]_c est de 45.80 ± 6.90; p< 0.01 et du [Ca]_n est de 131.30 ± 25.72; p< 0.01; n=6, puis, à 10⁻⁵ M on observe la même chose (cytosol 10⁻⁵ M: 45.80 ± 6.90; noyau 10⁻⁵ M: 131.31 ± 25.72; p< 0.01; n=6) .

Les panneaux B et D de la figure 24 montrent les courbes dose-réponse de l'effet de l'ET-1 sur les niveaux soutenus du calcium cytosolique et nucléaire dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. Comme nous pouvons remarquer, l'ET-1 à des concentrations de 10⁻¹⁷ M à 10⁻⁵ M, induit une augmentation dose-dépendante du [Ca]_c et du [Ca]_n. La valeur de l'EC₅₀ pour les CEEDs est de 3.28

$\times 10^{-10}$ M pour le cytosol et 2.95×10^{-10} M pour le noyau ($n=6-19$), alors que pour les CEEGs, l' EC_{50} est de 1.25×10^{-11} M pour le cytosol et de 1.3×10^{-11} M pour le noyau ($n=6$).

En conclusion, ces résultats montrent que l'ET-1 induit une augmentation concentration-dépendante du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines avec des EC_{50} de l'ordre de 10^{-10} M (cytosol et noyau) et de 10^{-11} M (cytosol et noyau) pour les CEEDs et les CEEGs, respectivement. Ces résultats suggèrent donc qu'au niveau de ces cellules, l'augmentation calcique nucléaire induite par l'ET-1 extracellulaire est due en grande partie à l'augmentation de l'influx calcique à travers la membrane de surface.

3.5. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs ET_A (BQ123) et ET_B (BQ788), sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 (10^{-10} M) dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs du cœur fœtal âgé de 20 semaines est relayée via l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B . La concentration d'ET-1 choisie pour effectuer ces expériences est de 10^{-10} M, concentration équivalente à l' EC_{50} pour les CEEDs et très près de l' EC_{50} des CEEGs. Il

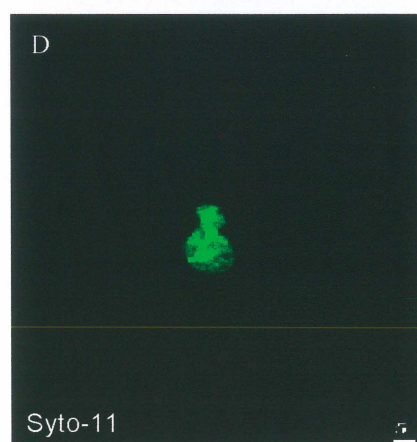
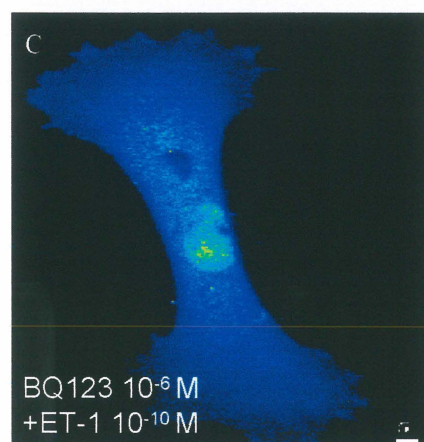
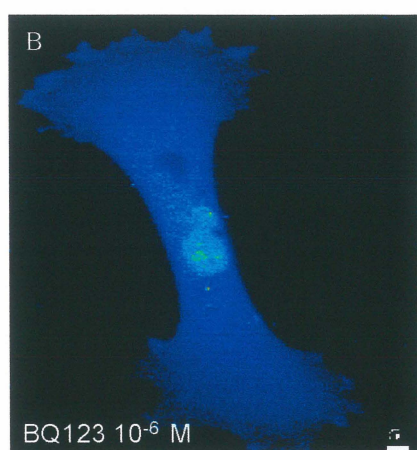
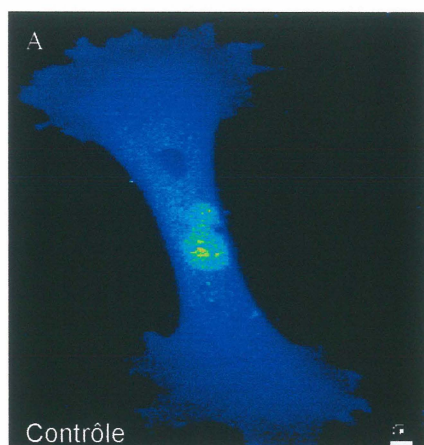
est à noter que cette concentration est capable de produire une augmentation soutenue statistiquement significative mais non saturante du calcium cytosolique et nucléaire.

En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et la microscopie confocale, nous avons démontré la présence du récepteur ET_A dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Afin d'étudier le rôle de ce récepteur dans la réponse calcique induite par l'ET-1, nous avons utilisé le BQ123, un antagoniste spécifique du récepteur ET_A (IHARA *et al.*, 1992).

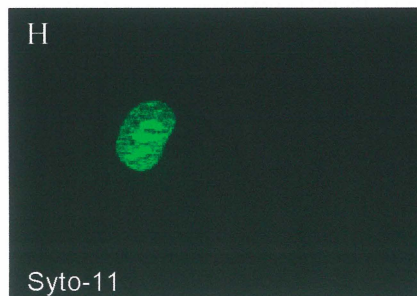
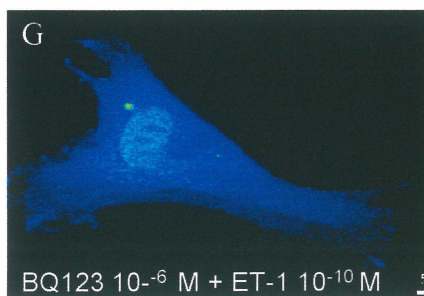
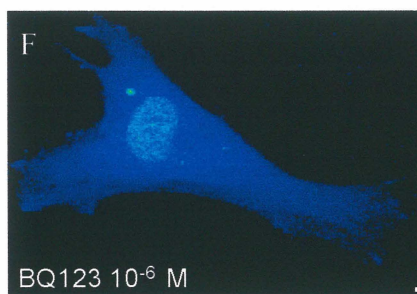
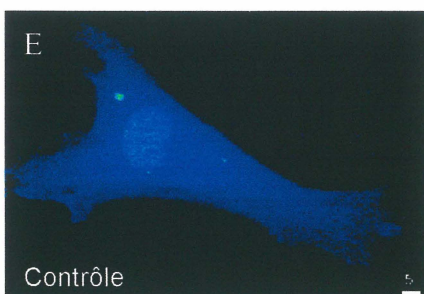
Dans cette série d'expériences, en utilisant la microscopie confocale et la sonde fluo-3 sensible au calcium, nous avons testé l'effet du prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec le BQ123 sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1. La figure 25 montre un exemple typique du niveau de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$ des CEEDs (panneaux A, B et C) et des CEEGs (panneaux E, F et G) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. La figure 26 illustre la moyenne des mesures des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des CEEDs (n=11) (figure 26A) et des CEEGs (n=4) (figure 26B). Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10^{-6} M de BQ123, une concentration connue pour bloquer complètement le récepteur ET_A (CHOUFANI, 2002). Pour les CEEDs et comme l'illustre la figure 26A, en condition contrôle, le niveau du $[Ca]_c$ est de 33.06 ± 1.10 alors que le niveau du $[Ca]_n$ est de 75.37 ± 4.90 (n=11). En présence du BQ123, le niveau de $[Ca]_c$ est de 33.78 ± 1.70 tandis que le niveau de $[Ca]_n$ est de 73.07 ± 5.60 (n=11). L'addition d'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M n'affecte pas le niveau de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$ (cytosol:

Figure 25 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ123, sur l'augmentation soutenue du niveau de [Ca]_c et de [Ca]_n induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Les panneaux A et E représentent une CEED et une CEEG isolées de cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en milieu contrôle. Il est à noter que les cellules montrent un niveau de [Ca]_i légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. L'ajout de l'antagoniste du récepteur ET_A (le BQ123, 10⁻⁶ M), n'affecte pas les niveaux de [Ca]_c et [Ca]_n des CEEDs (B) et CEEGs (F). En présence du BQ123, l'addition de l'ET-1, à une concentration de 10⁻¹⁰ M, n'affecte pas les niveaux du [Ca]_c et [Ca]_n des CEEDs (C) et des CEEGs (G). (D et H) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le syto-11. La représentation des images est indiquée selon une échelle de pseudocouleur représentant l'intensité de fluorescence du complexe fluo-3/Ca²⁺ allant de 0 à 255. La couleur des panneaux D et H n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en µm. A et E sont 2 cellules différentes de 2 expériences indépendantes.



CEED

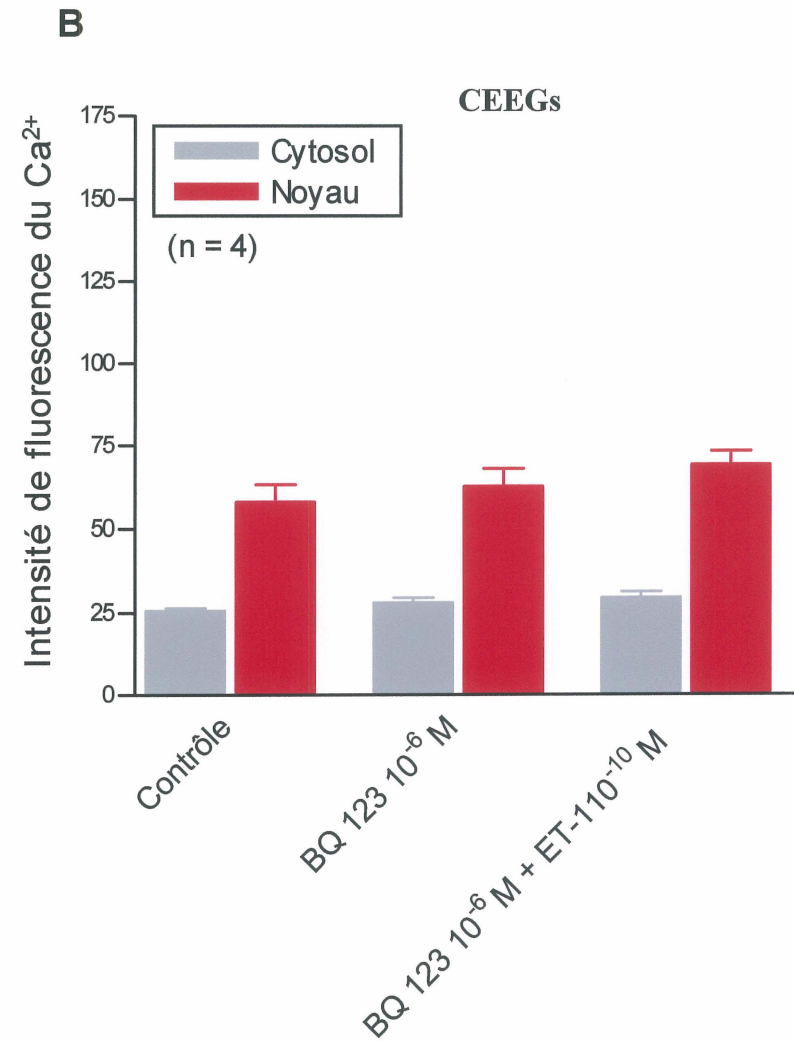
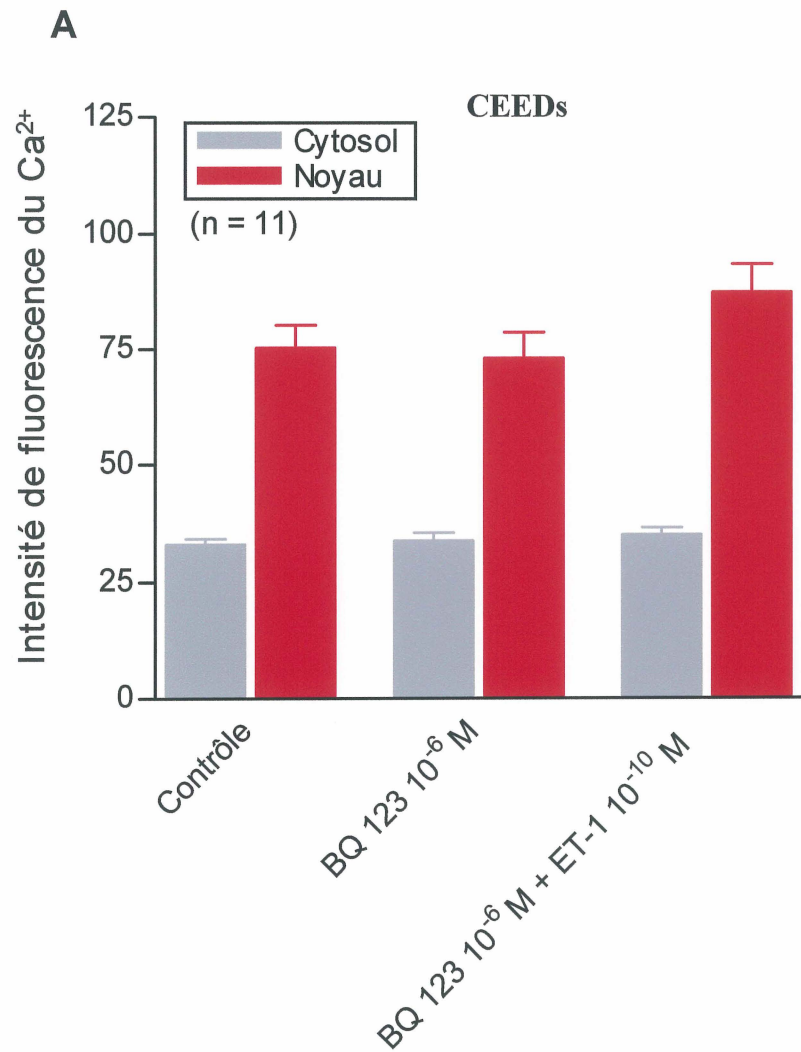


CEEG

Figure 26 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ123, sur l'augmentation soutenue du [Ca]_c et du [Ca]_n induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Ces histogrammes représentent la mesure de l'intensité de fluorescence du [Ca]_c et du [Ca]_n des CEEDs (A) et des CEEGs (B) isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. En présence de l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ123, l'addition de l'ET-1 (10^{-10} M) n'induit pas une augmentation du [Ca]_c et du [Ca]_n au niveau des CEEDs (A) et des CEEGs (B). Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. Pour les mesures du calcium en 3-D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique cytosolique et nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3-D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées. «n» est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes pour les CEEDs et de 2 pour les CEEGs.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A , le BQ123, sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœur isolées fœtaux humains âgés de 20 semaines.



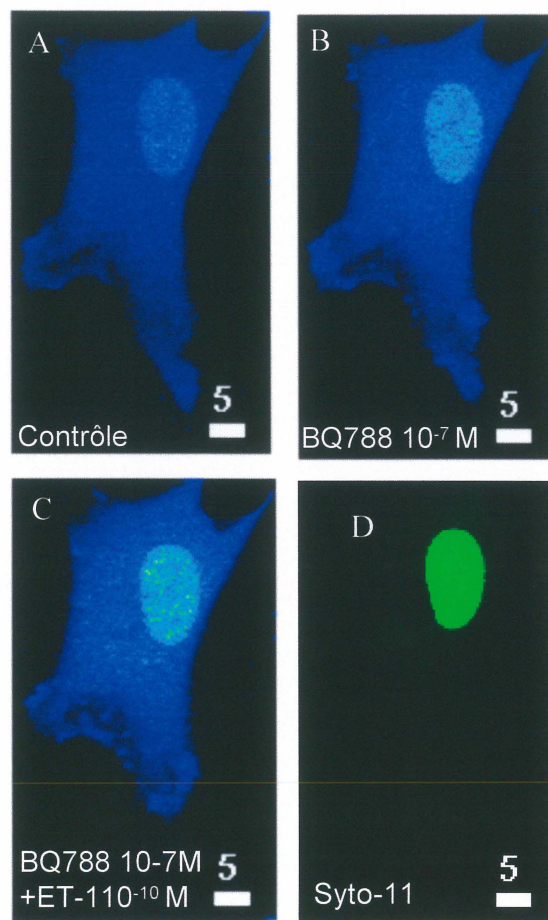
35.03 \pm 1.50; noyau: 87.42 \pm 6.20; n=11). Pour les CEEGs, comme on peut le remarquer dans la figure 26B, en condition contrôle, le niveau de $[Ca]_c$ est de 25.71 \pm 0.70 tandis que le niveau de $[Ca]_n$ est de 57.91 \pm 5.30 (n=4). En présence de l'antagoniste, les niveaux de $[Ca]_c$ est de 28.10 \pm 1.40 tandis que les niveaux de $[Ca]_n$ est de 62.67 \pm 5.40 (n=4). L'addition de l'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M n'affecte pas les niveaux de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$ (cytosol: 29.58 \pm 1.70; noyau: 69.16 \pm 4.10; n=4). Ces résultats montrent que le BQ123, un antagoniste du récepteur ET_A, est capable de complètement prévenir l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines suggérant donc une implication du récepteur ET_A dans la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 au niveau de ces cellules et confirmant les résultats obtenus sur le $[Ca]_i$.

En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et la microscopie confocale, nous avons déjà démontré la présence du récepteur ET_B dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Afin de vérifier si ce récepteur participe aussi à l'effet de l'ET-1 au niveau de ces cellules, nous avons utilisé le BQ788, un antagoniste spécifique du récepteur ET_B (ISIKAWA *et al.*, 1994) à une concentration de 10^{-7} M.

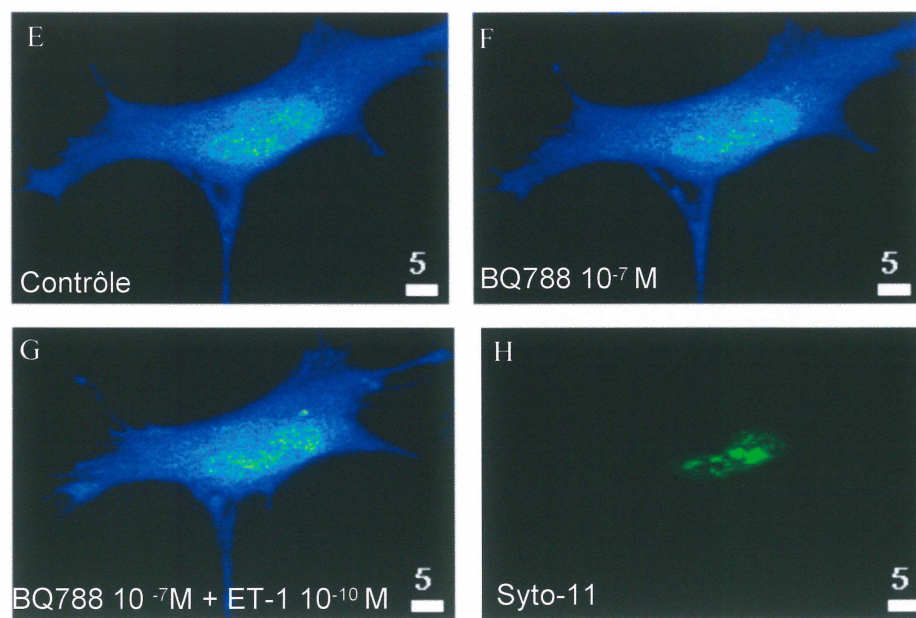
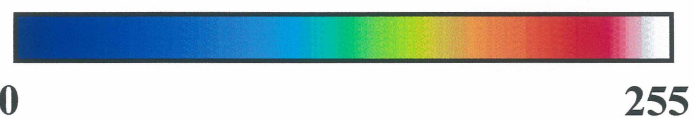
En utilisant la microscopie confocale et la sonde fluo-3 sensible au calcium, nous avons testé l'effet du prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec le BQ788 sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1. La figure 27 montre

Figure 27 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B , le BQ788, sur l'augmentation soutenue du niveau de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Les panneaux A et E représentent une CEED et une CEEG isolées de cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en milieu contrôle. Il est à noter que les cellules montrent un niveau de $[Ca]_i$ légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. L'ajout de l'antagoniste du récepteur ET_B (le BQ788, 10^{-7} M), n'a pas d'effet sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEDs (B) et CEEGs (F). En présence du BQ788, l'addition de l'ET-1, à une concentration de 10^{-10} M, cause une augmentation dans les niveaux du $[Ca]_n$ des CEEDs seulement (C). (D et H) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le syto-11. La représentation des images est indiquée selon une échelle de pseudocouleur représentant l'intensité de fluorescence du complexe fluo-3/ Ca^{2+} allant de 0 à 255. La couleur des panneaux D et H n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm . A et E sont deux cellules différentes de 2 expériences indépendantes.



CEED



CEEG

un exemple des niveaux de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$ d'une CEED (panneaux B et C) et d'une CEEG (panneaux F et G) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10^{-7} M de BQ788. Comme l'illustre la figure 27, le BQ788 lui-même n'affecte pas les niveaux de $[Ca]_c$ ou de $[Ca]_n$ au niveau des CEEDs et des CEEGs (panneaux B et F). Cependant, au niveau des CEEDs, il prévient l'augmentation soutenue dans le niveau de $[Ca]_c$ induite par l'ET-1 (10^{-10} M), mais pas dans le niveau du $[Ca]_n$ véhiculée par ce peptide (panneau C). Cependant, au niveau des CEEGs (panneau G), le BQ788, prévient l'augmentation soutenue dans les niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ véhiculée par l'ET-1 (10^{-10} M).

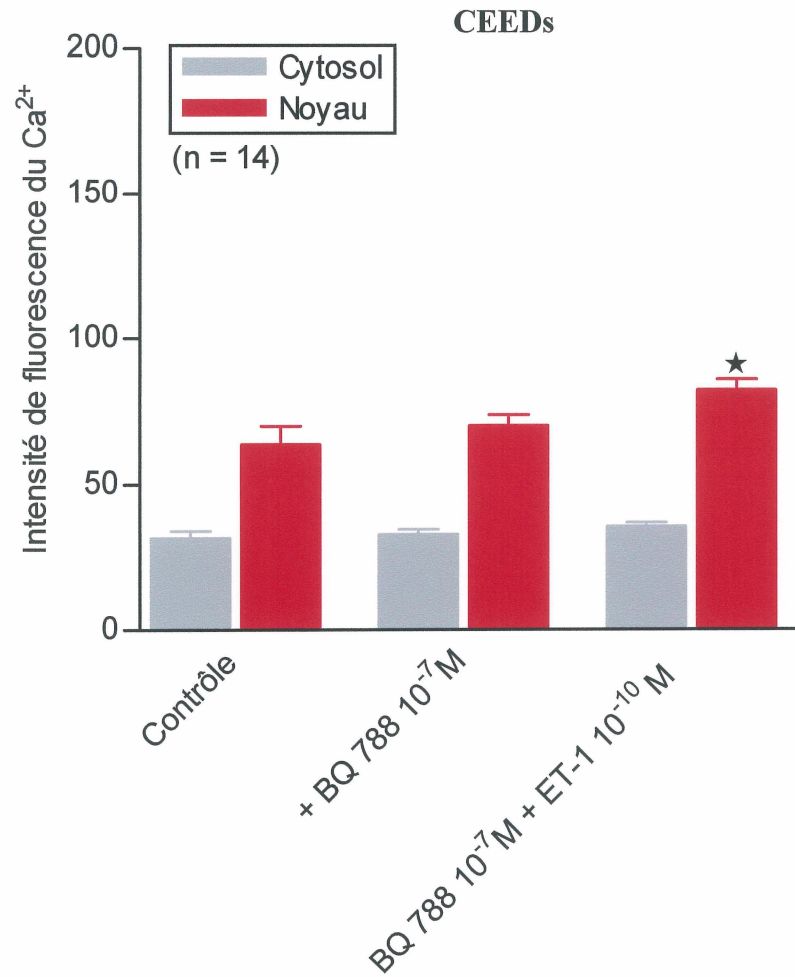
Les panneaux A et B de la figure 28 illustrent la moyenne des mesures des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des CEEDs (n=14) (figure 28A) et des CEEGs (n=6) (figure 28B). Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10^{-7} M de BQ788, une concentration connue pour complètement bloquer le récepteur ET_B (CHOUFANI, 2002). Pour les CEEDs et comme l'illustre la figure 28A, en condition contrôle, le niveau de $[Ca]_c$ est de 31.86 ± 2.40 alors que le niveau de $[Ca]_n$ est de 63.78 ± 6.10 (n=11). En présence du BQ788, le niveau de $[Ca]_c$ est de 33.03 ± 1.70 tandis que le niveau de $[Ca]_n$ est de 70.05 ± 3.70 (n=14). L'addition d'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M n'affecte pas le niveau du $[Ca]_c$ (35.77 ± 1.40 ; n=14), mais augmente de façon significative le niveau du $[Ca]_n$ (82.17 ± 3.80 ; $p < 0.05$; n=14). Pour les CEEGs, comme on peut le remarquer dans la figure 28B, en condition contrôle, le niveau de $[Ca]_c$ est de 32.96 ± 1.74 tandis que le niveau de $[Ca]_n$ est de

Figure 28 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B, le BQ788, sur l'augmentation soutenue du [Ca]_c et du [Ca]_n induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

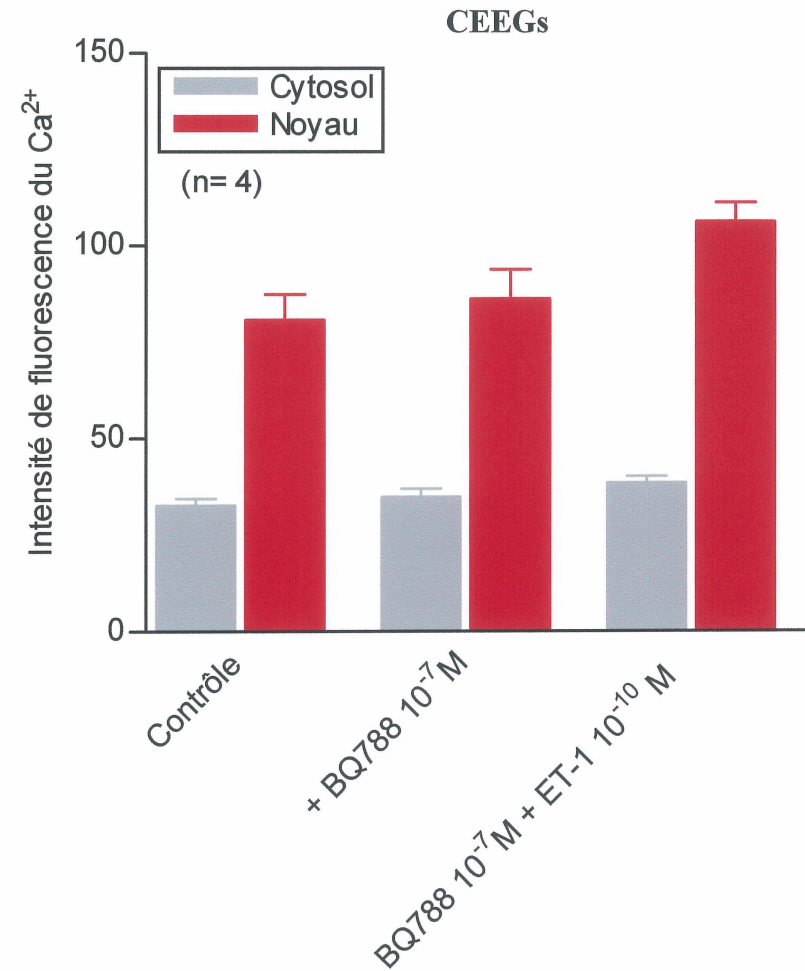
Ces histogrammes représentent la mesure de l'intensité de fluorescence du [Ca]_c et du [Ca]_n des CEEDs (A) et des CEEGs (B) isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. En présence de l'antagoniste du récepteur ET_B, le BQ788, l'addition de l'ET-1, à une concentration de 10^{-10} M, induit seulement une augmentation significative dans le niveau du [Ca]_n des CEEDs sans affecter le niveau du [Ca]_c de ces cellules (A) tandis qu'au niveau des CEEGs (B) l'addition de l'ET-1 (10^{-10} M) en présence du BQ 788 (10^{-7} M) n'affecte pas les niveaux du [Ca]_c et [Ca]_n des CEEGs (B). Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. ★ $p < 0.05$ et ★★ $p < 0.01$. Pour les mesures du calcium en 3-D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique cytosolique et nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3-D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées. «n» est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes pour les CEEDs et pour les CEEGs.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B, le BQ788, sur l'augmentation soutenue du [Ca]_c et du [Ca]_n induite par l'ET-1 dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœur isolées fœtaux humains âgés de 20 semaines.

A



B



80.65 ± 6.66 (n=4). En présence de l'antagoniste, le niveau de $[Ca]_c$ est de 35.03 ± 2.09 tandis que le niveau de $[Ca]_n$ est de 86.14 ± 7.72 (n=4). L'addition de l'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M n'affecte pas les niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ (cytosol: 38.74 ± 1.53 ; noyau: 106.27 ± 4.99 n=4). Ces résultats montrent que le BQ788, un antagoniste du récepteur ET_B , est capable de prévenir l'effet de l'ET-1 sur le niveau du $[Ca]_c$ des CEEDs, mais pas au niveau du $[Ca]_n$, tandis que ce même antagoniste prévient l'effet de l'ET-1 au niveau du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des CEEGs, suggérant donc une implication du récepteur ET_B dans la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 au niveau des CEEDs et des CEEGs et confirmant avec plus de précision les résultats obtenus sur le $[Ca]_i$.

IV. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

L'ET-1, le vasoconstricteur le plus puissant, est un peptide de 21 acides aminés qui est présent dans plusieurs tissus et qui accomplit plusieurs actions biologiques (RUBANY et POLOKOF, 1994; GRAY et WEBB, 1996). Au niveau vasculaire, des études ont démontré que le récepteur ET_A est présent dans les cellules du muscles lisse et médie une vasoconstriction prolongée (MARSAULT *et al.*, 1993; BKAILY, 1994) tandis que le récepteur ET_B est présent au niveau des cellules endothéliales et médie une vasodilatation NO-dépendante (YANAGISAWA et MASAKI, 1989). De plus, le récepteur ET_B semble jouer un rôle important dans l'élimination de l'ET-1 plasmatique (DUPUIS *et al.*, 1996; FUKURODA *et al.*, 1994; OPGENORTH *et al.*, 2000; BERTHIAUME *et al.*, 2000). Au niveau du cœur, plusieurs études ont rapporté que l'ET-1, secrété des cellules endothéliales endocardiques, affecte la fonction des cardiomyocytes sous-jacents (MEBAZAA *et al.*, 1993). Cependant, la plupart de ces études n'ont pas tenues compte de l'origine ventriculaire des cellules endothéliales endocardiques (CEEs) ainsi que la différence anatomique et fonctionnelle qui peut avoir lieu entre les CEEs isolées à partir du ventricule droit (CEEDs) et gauche (CEEGs) (BRUTSAERT, 2003). Récemment, notre groupe a montré que les CEEs isolées à partir du ventricule droit du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines possèdent non seulement des récepteurs Y₁ et Y₂ au neuropeptide Y (NPY) mais également le NPY lui-même (JACQUES *et al.*, 2003; SADER, 2002). De plus, il a été démontré que seulement les CEEs issues du ventricule droit sont capables de sécréter le NPY et que cet peptide est aussi comme l'ET-1, un facteur endothélial (JACQUES *et al.*, 2003; SADER, 2002). Ces études ont également démontré qu'effectivement il existe une différence entre les CEEDs et les CEEGs en ce qui concerne les types de récepteurs au

NPY présents ainsi que leurs distributions transcellulaires, densités et contributions à la modulation du Ca^{2+} intracellulaire de ces cellules (SADER, 2002). Notre groupe a également rapporté que les CEEs possèdent les récepteurs AT_1 et AT_2 ainsi que l'Ang II (JACQUES *et al.*, 2003; ABDEL-MALAK, 2003) et que la densité du récepteur AT_1 est plus élevée au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs tandis que l'inverse est observé pour le récepteur AT_2 . Dans cette même étude (JACQUES *et al.*, 2003), il a été aussi démontré que l'Ang II induit une augmentation dose-dépendante du calcium cytosolique et nucléaire avec des valeurs d' EC_{50} plus faibles au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs (ABDEL-MALAK, 2003). D'autres preuves expérimentales dans la littérature suggèrent également des différences entre les CEEDs et les CEEGs (NOSAKA *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999). Par exemple, la relâche de la prostaglandine (PGI_2) est plus élevé au niveau des CEEGs par rapport au CEEDs isolées du coeur de porc adulte lorsqu'il y a une augmentation de la pression transmurale (NOSAKA *et al.*, 1997) tandis que l'expression et les sites de liaisons au peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) sont plus abondants au niveau des CEEDs par rapport aux CEEGs isolées des ventricules du coeur de rat adulte (KIM *et al.*, 1999).

Puisque aucune étude n'est disponible concernant la présence de l'ET-1 et ses récepteurs au niveau des CEEs humaines, dans ce mémoire de maîtrise, nous avons voulu vérifier si comme le NPY et l'Ang II et leurs récepteurs respectifs, l'ET-1 et ses récepteurs ET_A et ET_B sont aussi présents au niveau des CEEDs et CEEGs isolées du coeur fœtal humain âgé de 20 semaines. Nous avons également voulu vérifier si la densité et/ou la distribution de l'ET-1 et de ses récepteurs ainsi que la contribution de

ceux-ci à la modulation du Ca^{2+} intracellulaire, sont différentes dans les CEEDs par rapport aux CEEGs.

4.1. Présence et distribution de l'ET-1 et des récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

En utilisant l'immunofluorescence indirecte jumelée à la microscopie confocale en 3-D, nos résultats ont démontré la présence de l'ET-1 au niveau des CEEDs et CEEGs. L'ET-1 semble être distribué de façon hétérogène dans les deux types de CEEs i.e. au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et plus particulièrement au niveau nucléaire (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire). La présence de l'ET-1 dans ces cellules suggère que, comme les CEs en général, les CEEs peuvent sécréter ce facteur et ainsi induire une augmentation de la contraction cardiaque (MEBAZAA *et al.*, 1993). Cependant, notre étude a montré pour la première fois que ce peptide est aussi présent non seulement au niveau du cytosol mais aussi au niveau de l'espace périnucléaire et nucléoplasmique des CEEDs et CEEGs. Ces résultats sont similaires à ceux récemment rapportés dans les CMLVs aortiques humaines adultes (CHOUFANI, 2002). La présence de l'ET-1 au niveau du noyau incluant l'espace périnucléaire suggère que ce peptide peut être directement synthétisé dans le noyau et donc être disponible pour activer les récepteurs ET_A et/ou ET_B des membranes nucléaires. En accord avec cette hypothèse, Iborra *et al.* (2001) ont

démonté la présence de sites de traduction nucléaire en marquant des cellules Hela de mammifère ou de noyau purifié avec de la lysine fluorescente. Ils ont observé que l'accumulation de fluorescence nucléaire dépendait du temps et était sensible à la cycloheximide et à la puromycine, des inhibiteurs de la synthèse protéique. De plus, les auteurs estiment que 10 à 15 % de la synthèse protéique de la cellule se fait au niveau nucléaire.

Nos résultats suggèrent également que la densité de l'ET-1 est plus élevée au niveau du cytosol et du noyau des CEEDs par rapport au CEEGs. Ces résultats suggèrent qu'une différence existe entre les CEEDs et les CEEGs au niveau de la densité de l'ET-1. Cette différence suggère aussi que les CEEDs ont probablement un potentiel de sécrétion de l'ET-1 plus élevé que les CEEGs et ceci doit être vérifié dans le futur. La présence de l'ET-1 et de ses récepteurs à l'intérieur de la cellule suggère qu'ils proviennent peut-être de l'internalisation du complexe ET-1/récepteur ET_A et/ou ET_B et qu'ils sont translocalisés au noyau et/ou qu'ils sont synthétisés directement au niveau nucléaire (IBORRA *et al.*, 2001; BKAILY *et al.*, 2003). Ces deux hypothèses restent à être vérifiées. Par contre, puisque dans nos expériences les cellules ont été privées de sérum, i.e du milieu de culture contenant du FBS, et que nos expériences ont été effectuées en absence d'ET-1 extracellulaire, il est donc hautement probable que l'ET-1 mesuré est le produit d'une synthèse intracellulaire. D'autres études doivent être effectuées afin de vérifier cette hypothèse en utilisant des noyaux isolés de CEEs ainsi que des inhibiteurs de synthèse protéique.

Nos résultats ont aussi démontré que les CEEs issues des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines possèdent le récepteur ET_A. L'absence du récepteur ET_A dans les cellules endothéliales vasculaires (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 2002) et la présence de ce type de récepteur dans les CEEs supportent l'idée qu'une différence majeure existe entre l'endothélium endocardique et l'endothélium vasculaire (BRUTSAERT, 2003). Ce type de récepteur dans les CEEs semble être présent non seulement au niveau de la membrane plasmique mais également au niveau du cytosol et du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire. Il est à noter que ce type de récepteur semble aussi être présent dans les membranes de l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes ventriculaires du rat adulte (BOIVIN *et al.*, 2003) mais pas dans les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLVs) aortique humain adulte (CHOUFANI, 2002). La présence des récepteurs ET_A dans les membranes nucléaires des cardiomyocytes ventriculaires (BOIVIN *et al.*, 2003) et des CEEs (cette étude) peut être due à l'origine cardiaque de l'endothélium endocardique. L'activation de ce type de récepteur au niveau des membranes nucléaires des CMLVs (BKAILY *et al.*, 2003) et des cardiomyocytes (BOIVIN *et al.*, 2003) a été rapporté pour moduler le Ca²⁺ libre nucléaire. Également, nos résultats suggèrent qu'il n'y a pas de différence significative dans la densité des récepteurs ET_A au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) par rapport au noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs ou des CEEGs. De plus, il n'y a pas de différence significative dans la densité des récepteurs ET_A au niveau des CEEDs par rapport aux CEEGs ceci suggère que ce type de récepteur peut contribuer d'une façon égale à la fonction des CEEDs et CEEGs.

Nos résultats ont également montré que les CEEDs et les CEEGs possèdent aussi le récepteur ET_B. Donc, tout comme les CEVs (YANAGISAWA et MASAKI, 1989), les CEEs ventriculaires humaines possèdent les récepteurs à l'ET-1 de type ET_B. Par contre, ce type de récepteurs semble être présent, non seulement au niveau de la membrane plasmique et du cytosol, mais aussi plus particulièrement au niveau du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEDs et les CEEGs. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par notre groupe dans les CMLVs aortiques humaine (CHOUFANI, 2002) ainsi que par le groupe de ALLEN dans les cardiomyocytes ventriculaires du rat adulte (BOIVIN *et al.*, 2003). Nos résultats suggèrent aussi qu'à l'opposé des récepteurs ET_A, la densité des récepteurs ET_B est significativement plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol et ceci dans les CEEGs et les CEEDs. De plus, nous avons démontré que la densité du récepteur ET_B est plus élevée au niveau du cytosol et du noyau des CEEGs par rapport aux CEEDs. Ces résultats suggèrent que la contribution des récepteurs ET_B à l'effet de l'ET-1 sur la fonction des CEEs peut être plus importante dans les CEEGs par rapport aux CEEDs. Puisque les récepteurs ET_B semblent être aussi impliqués dans l'élimination de l'ET-1 plasmatique (DUPUIS *et al.*, 1996; FUKURODA *et al.*, 1994; OPGENORTH *et al.*, 2000), il est donc possible de postuler que la présence d'une haute densité des récepteurs ET_B dans les CEEGs peut expliquer en partie le rôle de ce type de cellules dans la régulation (ou l'ajustement) du niveau plasmatique de l'ET-1 artériel (BRUTSAERT, 2003). Il est vrai que les résultats obtenus en western blot ne supportent pas nécessairement les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte et visualisé à l'aide de la microscopie confocale. Ceci peut-être en partie dû au fait que

les résultats en western blot sont obtenus à partir des protéines totales et ne font pas de distinction entre les niveaux cytosolique et nucléaire. De plus, il est possible que le système de microscopie confocale (mesure en 3-D) soit plus adéquat et permet de déceler des variations et des niveaux de récepteurs d'une façon plus précise que le permet la technique de western blot. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les niveaux nucléaires du récepteur ET_B à partir des CEEDs et CEEGs en utilisant le western blot afin de confirmer les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte.

Notre étude a aussi montré la cohabitation de l'ET-1 près de ces récepteurs au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire. Ceci suggère que ce peptide est disponible pour activer ses récepteurs partout où ceux-ci sont présents des membranes nucléaires. Des études de double (récepteur et Ca²⁺ libre) ou triple (récepteurs ET_A et ET_B et Ca²⁺ libre) marquage des noyaux isolés de CEEDs et CEEGs sont nécessaires afin de déterminer le rôle de l'ET-1 et de ses récepteurs ET_A et/ou ET_B dans la régulation du Ca²⁺ nucléaire.

Nos résultats ont démontré que non seulement les récepteurs ET_A et l'ET-1 sont présents au niveau du noyau mais aussi le récepteur ET_B. De façon similaire, la littérature a rapporté la présence de différents types de récepteurs couplés aux protéines G ainsi que leurs ligands au niveau du noyau, comme par exemple, les récepteurs de l'hormone parathyroïde (MASSFELDER *et al.*, 1997), les récepteurs AT₁ et AT₂ à l'Ang II (JACQUES *et al.*, 2003; ABDEL-MALAK., 2003; BKAILY., 2003; BOOZ *et*

al., 1996), les récepteurs kappa aux opiacés (VENTURA *et al.*, 1998), les récepteurs EP₃ et EP₄ à la prostaglandine E₂ (BHATTACHARYA *et al.*, 1999; GOBEIL *et al.*, 2002), les récepteurs Y₁ au NPY (JACQUES *et al.*, 2003), les récepteurs B₁ et B₂ à la bradykinine (BKAILY *et al.*, 1997b), les récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGF-R) (CARPENTER et ZENDEGUI, 1986), les récepteur à l'insuline (VIGNERI *et al.*, 1978; HORVAT, 1978), les récepteurs au facteur activateur de plaquettes (PAF) (MARRACHE *et al.*, 2002) et les récepteurs cholinergiques muscariniques (LIND et CAVANAGH, 1993). On retrouve également plusieurs enzymes ou seconds messagers présents au niveau du noyau comme par exemple, la phosphatidylinositol 4-kinase (PI₄K) (PAYRASTRE *et al.*, 1992), la diacylglycerol kinase (PAYRASTRE *et al.*, 1992; BREGOLI *et al.*, 2001), la phospholipase C (PLC) (PAYRASTRE *et al.*, 1992, YORK *et al.*, 1999), la protéine kinase C (LEACH et RABEN, 1993; VENTURA *et al.*, 2003), la phospholipase D (PLD) (BALDASSARE *et al.*, 1997) ainsi que COX-1 et COX-2 (SPENCER *et al.*, 1998). De plus, plusieurs études dans la littérature ont été rapporté la présence des pompes et canaux ioniques au niveau des membranes nucléaires comme par exemple, les récepteurs à la ryanodine, à l'IP₃ et l'IP₄, la pompe Ca²⁺-ATPase, l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ et des canaux ioniques de type R (WICKMAN et CLAPHAM, 1995; GERASIMENKO *et al.*, 1996; BKAILY, 1994a; BKAILY *et al.*, 1997b; XIE *et al.*, 2002). Donc, le noyau semble être une cellule à l'intérieur d'une cellule qui possède certains types de canaux ioniques, échangeurs, pompes, récepteurs, seconds messagers et enzymes dépendamment du type cellulaire (BKAILY *et al.*, 2003).

Bien qu'ils existent des similitudes entre les récepteurs de la membrane plasmique et les récepteurs nucléaires, plusieurs études ont rapporté aussi des différences. Par exemple, HOCHER *et al.*, (1992) ont observé, sur des noyaux isolés d'hépatocytes de rat, que les récepteurs à l'ET-1 localisés au niveau nucléaire possèdent une plus grande affinité à l'ET-1 que ceux localisés au niveau de la membrane plasmique. De plus, BKAILY *et al.*, (2000; 2002) ont observé qu'au niveau des cardiomyocytes d'embryon de poulet, les récepteurs à l'ET-1 au niveau nucléaire sont dix fois plus sensible à l'ET-1 que les récepteurs qui sont présents au niveau de la membrane plasmique. De même, GOBEIL *et al.*, (2002) ont démontré que les récepteurs EP₃ au niveau des membranes nucléaires sont couplés à des voies de signalisation différentes par rapport à ceux au niveau de la membrane plasmique; les récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique étant couplés à l'adénylate cyclase tandis que ceux présents au niveau nucléaire ne le sont pas (GOBEIL *et al.*, 2002). De plus, MARRACHE *et al.*, (2002) ont montré que contrairement aux récepteurs PAF présents au niveau de la membrane plasmique, les récepteurs PAF présents au niveau nucléaire sont sensibles à la toxine de pertussis. Également, il a été rapporté que l'activation des récepteurs des membranes de l'enveloppe nucléaire peut avoir un effet direct sur le noyau. Par exemple, l'activation des récepteurs ET-1 des membranes nucléaires (BKAILY *et al.*, 2002) et du récepteur AT₁ nucléaire de l'Ang II (BKAILY *et al.*, 1997b) au niveau des cardiomyocytes d'embryon de poulet ainsi que du récepteur ET_B nucléaire (BKAILY *et al.*, 1997b; 2003b) des cellules du muscle lisse vasculaire humain, cause une augmentation du [Ca]_n libre due à la mobilisation du Ca²⁺ nucléoplasmique probablement via une voie dépendante de l'IP₃ (BKAILY, 2000)

du réticulum nucléoplasmique (ECHEVARRIA *et al.*, 2003) ou due à l'activation du canal calcique de type R présent au niveau du noyau (BKAILY, 1994). De même, Gobeil *et al.* (2002) ont rapporté que le récepteur EP₃ de la prostaglandine, présent au niveau des membranes nucléaires des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux de porc, induit l'expression de la eNOS lorsque stimulé par un analogue de PGE₂ dans ces cellules impliquant l'activation des canaux K⁺ dépendant du Ca²⁺, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase), la MAP kinase kinase (MEK) et la voie de NF-κB. De plus MARRACHE *et al.* (2002) ont montré que la stimulation des récepteurs PAF présents au niveau des noyaux isolés des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux de porc cause une diminution dans la production d'AMPC, une augmentation de [Ca]_n (sensible à la toxine de pertussis), provoque une augmentation dans le niveau de la phosphorylation des kinases régulées par le signal extracellulaire 1 et 2 (ERK 1/2) ainsi qu'une augmentation dans la liaison de NF-κB à l'ADN. Toutes ces études suggèrent que les récepteurs présents au niveau des membranes nucléaires incluant les récepteurs à l'ET-1, sont fonctionnels et que ceux-ci partagent des similarités et des différences avec les récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique. Des études additionnelles sont nécessaires afin de déterminer les rôles possibles des récepteurs ET_A et ET_B de la membrane nucléaire dans les fonctions des CEEDs et CEEGs.

Par contre, il est possible que, comme dans les CMLVs et les CEVs, l'ET-1, via l'activation de ces récepteurs ET_A et ET_B, puisse stimuler la synthèse protéique et provoquer l'hypertrophie (DOUGLAS et OHLSTEIN, 1997; GUARDA *et al.*, 1993)

et/ou agir comme un facteur antiapoptotique (SHICHIRI *et al.*, 1997) sur les CEEDs et les CEEGs.

Il est aussi possible que l'ET-1 via l'activation de ses récepteurs ET_B inhibe la croissance (ITOH *et al.*, 1988; MALLAT *et al.*, 1995) et/ou induit l'apoptose (CATTARUZZA *et al.*, 2000), au niveau des CEEs et en particulier au niveau des CEEGs ou la densité de ce type de récepteur semble être très élevée par rapport aux CEEDs.

Ainsi la présence des récepteurs ET_A et ET_B au niveau de la membrane plasmique, le cytosol et le noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire ainsi que l'ET-1 au niveau du cytosol et du noyau des CEEs suggèrent que ces récepteurs jouent un rôle important dans la propagation des effets de l'ET-1 dans plusieurs fonctions de ces cellules. De plus, la présence des récepteurs ET_A et ET_B nucléaires (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et de l'ET-1 peut suggérer qu'ils jouent un rôle important dans la régulation de la fonction nucléaire comme par exemple dans la transcription des gènes, l'apoptose, la prolifération et dans la modulation du transport calcique à travers les membranes nucléaires. Cependant, ces fonctions possibles restent encore à être démontrées au niveau des CEEs.

4.2. Effet de l'ET-1 sur les niveaux de $[Ca]_i$ des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines et type de récepteur responsable de cet effet.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons étudié l'effet de l'ET-1 sur le niveau du calcium intracellulaire libre ($[Ca]_i$) des CEEDs et CEEGs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines à l'aide du système d'imagerie en 2-D et de la sonde ratiométrique le fura-2. Cet ion est connu d'être directement impliqué dans la contraction des cellules musculaires et la sécrétion des cellules non musculaire (RETTIG et NEHER, 2002) comme les CEEs. Nos résultats montrent qu'une concentration d'ET-1 de l'ordre de 10^{-10} M i.e. une concentration près du niveau physiologique de l'ET-1 circulant (HAEGERSTRAND *et al.*, 1989) induit une augmentation soutenue du $[Ca]_i$. Un tel effet a aussi été rapporté pour une concentration d'ET-1 de l'ordre de 10^{-7} M dans les cellules du muscle lisse vasculaire de lapin (BKAILY *et al.*, 1992; 1995; 1997a; 1998). Nos résultats suggèrent que l'ET-1 circulant en augmentant le niveau de $[Ca]_i$ peut induire non seulement la sécrétion de facteurs endothéliaux, mais aussi peut indirectement activer plusieurs constituants cellulaires Ca^{2+} -dépendants. De plus, en utilisant la microscopie confocale en 3D et la sonde non-ratiométrique le fluo-3, nos résultats ont montré que l'augmentation du $[Ca]_i$ par l'ET-1 est dose-dépendante et a lieu au niveau du cytosol ainsi que du noyau. Nos résultats démontrent également qu'au repos le niveau du $[Ca]_n$ est plus élevé que celui du $[Ca]_c$ et que cette différence devient de plus en plus évidente après la stimulation induite par l'ET-1. Ce phénomène a été également observé au niveau de plusieurs types

cellulaires incluant les cellules du muscle lisse vasculaire humaine (CHOUFANI 2002; BKAILY *et al.*, 1997b). De plus, nos résultats montrent que dans les CEEDs, les valeurs de EC_{50} obtenues pour le cytosol et le noyau sont de l'ordre de 10^{-10} M, tandis que pour les CEEGs, les valeurs de EC_{50} obtenues pour le cytosol et le noyau sont de l'ordre 10^{-11} M suggérant ainsi que les CEEGs sont plus sensibles à l'ET-1 que les CEEDs. Cette plus grande sensibilité des CEEGs à l'ET-1 peut être expliquée en partie par la présence d'une densité plus élevée des récepteurs ET_B dans ce type de CEEs comparées au CEEDs. Ces résultats supportent donc une fois de plus notre hypothèse de travail i.e. qu'il existe des différences entre les CEEDs et les CEEGs, non seulement au niveau de la densité d'un type de récepteur, mais aussi au niveau du signal post-récepteuriel comme le Ca^{2+} . Notre étude montre donc qu'une différence entre les CEEDs et les CEEGs a lieu non seulement par rapport au NPY (SADER, 2002) et à l'Ang II (ABDEL-MALAK, 2003) mais aussi au niveau de leurs sensibilités à l'ET-1. De plus, puisque les valeurs de EC_{50} cytosolique et nucléaire sont similaires au niveau des CEEDs et des CEEGs, ceci suggère que l'augmentation du $[Ca]_n$ est en grande partie la conséquence de l'augmentation du $[Ca]_c$ (BKAILY *et al.*, 1996a; 1997b). Par contre, il est possible qu'une partie de cette augmentation du $[Ca]_n$ peut être due à l'activation des récepteurs des membranes nucléaires (BKAILY *et al.*, 2003; BOIVIN *et al.*, 2003). De telles possibilités doivent être vérifiées dans le futur.

Nos résultats démontrent également qu'une concentration très faible d'ET-1 (de l'ordre de 10^{-17} M) est capable d'induire une augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ à la fois dans les CEEDs et les CEEGs, suggérant encore que ces cellules sont extrêmement

sensibles à l'ET-1 par rapport aux autres types de cellules endothéliales (HASSAN, 2001). Une telle sensibilité élevée des CEEs aux facteurs circulants ne semble pas être limitée à l'ET-1 (JACQUES *et al.*, 2003; SADER, 2002; ABDEL-MALAK, 2003). Il est à noter que le niveau d'ET-1 circulant chez le fœtus humain est d'ordre 10^{-11} M (HAEGERSTRAND *et al.*, 1989). D'après notre étude, cette concentration d'ET-1 peut donc induire une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEDs et des CEEGs suggérant que les CEEs fœtales humaines contribuent à la relâche des facteurs cardioactifs calcium-dépendants, pouvant affecter non seulement la contractilité cardiaque (BRUSAERT et ANDRIES, 1992; SHAH, 1996) mais aussi le couplage excitation-sécrétion des CEEs (JACQUES *et al.*, 2003) ainsi que la différenciation, la migration, l'attachement et le cycle cellulaire des CEEs elles-mêmes et des cellules cardiaques (BRUTSAERT, 2003). Par exemple, la présence des CEEDs, et non les CEVs ou les fibroblastes, est nécessaire pour la différenciation des cardiomyocytes ventriculaires (BRUTSAERT, 2003). De plus, il a été aussi démontré que l'augmentation du $[Ca]_i$ est l'élément clé qui déclenche des cascades d'évènements nécessaires à la production du NO (GRAIER *et al.*, 1992; PARTON, 1996, MICHEL *et al.*, 1997; PRABHAKAR *et al.*, 1998), de la PGI_2 (CLARK *et al.*, 1995; PATEL *et al.*, 1996), de l'ET-1 (BKAILY *et al.*, 2003), du NPY (JACQUES *et al.*, 2003) ainsi qu'au relâchement des facteurs tels que le facteur von Willbrand (BIRCH *et al.*, 1992).

Bien que l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ des CEVs est relayé par le récepteur ET_B , notre étude a montré que l'activation du récepteur ET_A semble relayer, en grande partie, l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ des CEEs. En effet, l'étude de l'effet de l'ET-1 sur

les niveaux du $[Ca]_i$, en utilisant l'imagerie en 2-D et le fura-2, montre que le prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec l'antagoniste peptidique du récepteur ET_A , le BQ-123 (10^{-6} M), prévient l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ induite par l'ET-1. Nos résultats obtenus en microscopie confocale en 3-D et en utilisant le fluo-3 confirment les résultats obtenus sur le $[Ca]_i$ et montrent que le prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec l'antagoniste du récepteur ET_A prévient l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par l'ET-1. Ces résultats suggèrent que l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ dans les types de CEEs est relayé, en grande partie, par l'activation du récepteur ET_A .

En utilisant l'antagoniste peptidique du récepteur ET_B , le BQ788, nos résultats sur le $[Ca]_i$ confirment que l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ au niveau des CEEs est bien médié en grande partie par l'activation du récepteur ET_A . Par contre, notre étude en utilisant la microscopie confocale en 3D suggère que cet effet de l'ET-1 sur les CEEDs semble impliquer les récepteurs ET_A et ET_B de la membrane de surface. Effectivement, l'imagerie en 2D montre que l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ des CEEDs est prévenu par l'antagoniste du récepteur ET_A et non par l'antagoniste du récepteur ET_B . Par contre, ce dernier semble, comme l'antagoniste ET_A , prévenir l'augmentation significative de calcium libre au niveau du cytosol sans toutefois affecter le $[Ca]_n$. Donc, nos résultats suggèrent que l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique induite par l'ET-1 dans les CEEDs est due à l'activation des récepteurs ET_A et ET_B . Par contre, l'absence d'effet de l'antagoniste du récepteur ET_B sur l'augmentation du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 extracellulaire dans les CEEDs peut être due en partie à la faible densité des récepteurs

ET_B des membranes nucléaires de ce type des CEEs par rapport aux CEEGs. Il est à noter que dans des membranes nucléaires de cardiomyocytes ventriculaires de rat et de mouton, la liaison du [¹²⁵I]ET-1 a été réduite de 70 à 80 % par l'antagoniste peptidique du récepteur ET_A et de 20 à 30 % par l'antagoniste peptidique des récepteurs ET_B, le BQ788 (BOIVIN *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que les récepteurs ET_A des membranes nucléaires peuvent contribuer beaucoup plus à l'effet de l'ET-1 au niveau nucléaire. Ceci peut aussi expliquer, en partie, la prévention, par l'antagoniste du récepteur ET_A, de l'effet de l'ET-1 sur le [Ca]_n ainsi que l'absence d'effet de l'antagoniste du récepteur ET_B. Des études en radioliasion sur des membranes nucléaires des CEEDs sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. Nos résultats concernant l'implication des récepteurs ET_B dans l'augmentation du [Ca]_i dans les CEEGs, suggèrent l'implication de ce type de récepteur dans la modulation du [Ca]_c et [Ca]_n. Finalement, nos résultats montrent qu'une différence existe entre les CEEDs et les CEEGs qui se traduit par une densité plus importante des récepteurs ET_B dans les CEEGs ce qui explique son importante contribution à l'effet de l'ET-1 sur le [Ca]_c et [Ca]_n de ce type de CEEs. Nos résultats concernant le rôle du récepteur ET_A dans l'effet de l'ET-1 sur le [Ca]_i ainsi que le [Ca]_c et [Ca]_n montre, d'une façon sans équivoque, que ce type de récepteur, lui aussi médie l'effet de l'ET-1 aussi bien dans les CEEDs que les CEEGs. Il est logique de prévoir que ce type de récepteur médie en partie l'effet de l'ET-1 sur le [Ca]_c et [Ca]_n dans les CEEDs et CEEGs car nos résultats ont montré que la densité ainsi que la distribution de ce type de récepteur est similaire dans les deux types cellulaires.

En conclusion, nos résultats démontrent que: 1) les cellules endothéliales endocardiques isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines contiennent de l'ET-1 et possèdent les récepteurs ET_A et ET_B; 2) le récepteur ET_A est présent au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire); 3) la distribution et la densité du récepteur ET_A est similaire dans les CEEDs et les CEEGs; 4) le récepteur ET_B est présent au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et plus particulièrement au niveau du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire); 5) la densité du récepteur ET_B est plus élevée dans les CEEGs par rapport aux CEEDs; 6); l'ET-1 est présent au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et plus particulièrement au niveau du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire); 7) la densité de l'ET-1 au niveau cytosol et du noyau est plus élevée dans les CEEDs par rapport au CEEGs; 8) l'ET-1 a une concentration physiologique (10^{-10} M) induit une augmentation soutenue du $[Ca]_i$ au niveau des CEEDs et des CEEGs; 9) l'ET-1 induit une augmentation dose-dépendante de la concentration du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ dans les CEEDs et les CEEGs; 10) les CEEGs sont plus sensible à l'ET-1 que les CEEDs; 11) au niveau des CEEGs, l'ET-1 induit une augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ via l'activation des récepteurs ET_A et ET_B tandis qu'au niveau des CEEDs, cet effet est en grande partie dû à l'activation des récepteurs ET_A.

Ces résultats montrent clairement que l'ET-1 augmente le calcium intracellulaire des CEEs et peut donc ainsi moduler l'excitation-sécrétion de ces cellules et valide notre hypothèse de travail qu'une différence entre les CEEDs et les

CEEGs existe dans la densité des récepteurs à l'ET-1 ainsi que dans leurs sensibilités à l'ET-1. Ces résultats marquent donc le début d'une longue histoire où plusieurs chapitres restent encore à écrire.

4.3. Perspectives

1. Déterminer si la densité du récepteur ET_A, est plus petite ou plus grande que le récepteur ET_B au niveau des CEEDs et CEEGs en utilisant des radioligands ainsi que des agonistes et des antagonistes sélectifs pour ces types de récepteurs.
2. Confirmer les résultats obtenus en utilisant des noyaux isolés des CEEDs et des CEEGs afin de vérifier le type de récepteur impliqué dans l'activation du [Ca]_n.
3. Confirmer la fonction sécrétrice de l'ET-1 des CEEDs par rapport aux CEEGs.
4. Déterminer le(s) rôle(s) des récepteurs ET_A et ET_B de la membrane de surface et de la membrane nucléaire dans le cycle cellulaire et la survie des CEEDs et CEEGs.

V. REMERCIEMENTS

Je remercie profondément Dr. Danielle Jacques pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je la remercie sincèrement pour la formation scientifique qu'elle m'a offerte, pour sa supervision, ses encouragements, sa patience, sa confiance en moi et surtout pour le temps qu'elle m'a accordée tout au long de mes études de maîtrise.

Je voudrais également remercier sincèrement Dr. Fernand Gobeil et Dr. François Boudreau pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier Dr. Ghassan Bkaily pour ses conseils précieux et pour toutes les discussions scientifiques échangées qui m'ont beaucoup aidé durant mes travaux de recherches.

À Sawzan, pour les travaux effectués sur le calcium intracellulaire à l'aide de la microscopie confocale, un grand MERCI!

Je remercie chaleureusement mes collègues de laboratoire et mes amis, Claudine, Maud, Mirna, Johnny, Joe, Sawzan, Moni et Sana, pour l'atmosphère d'équipe qu'ils m'ont offert durant mes études. Je remercie aussi Ghassan Bkaily jr. et Dany Bkaily pour leur assistance technique.

De plus, je tiens à remercier tous les membres du département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire incluant professeurs, étudiants, assistants de recherche et secrétaires pour leur aide et leur support.

Le support financier de ce travail a été assuré par les subventions de recherche du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour Dr. Danielle Jacques.

VI. BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Malak N.A.K. (2003). L'angiotensine II et ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales endocardiques humaines : rôle dans la modulation du calcium intracellulaire. *Université de Sherbrooke*.

Andries L.J., et Brutsaert D.L. (1990). Differences in functional structure between endocardial endothelium and vascular endothelium. *Eur. Heart J.* **11**: 78.

Andries L.J., et Brutsaert D.L. (1994). Endocardial endothelium: Functional Morphology. Austin, TX, Landes, P: 143.

Anversa P., Giacomelli F., et Wiener J., (1975). Intercellular junctions of rat endocardium. *Anat. Rec.* **183**: 477-484.

Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., et Nakanishi S., (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. **348**:730-2.

Arai H., Nakao K., Takaya K., Hosada K., Ogawa Y., Nakanishi S., et Imura H. (1993). The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J.Biol.Chem.* **268**: 6463-3470.

Baker P.F., Hodgkin A.L., et Ridgway E.B. (1971). Depolarisation and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol.* **218**: 709-755.

Baldassare J.J., Jarpe M.B., Alferes L., et Raben D.M. (1997). Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J. Biol. Chem.* **272**: 4911-4.

Barritt G.J. (1999). Receptor-activated Ca^{2+} inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca^{2+} signalling requirements. *Biochem. J.* **337**: 153-69.

Bartlett S.R, Sawdy R., Mann G.E. (1994). Induction of cyclooxygenase-2 expression in human myometrial smooth muscle cells by interleukin-1beta: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Physiol.* **15;520 Pt 2**:399-406.

Baynash A.G., Hammer R.E., Richardson J.A., et Yanagisawa M. (1997). Severe growth retardation and juvenile lethality in ET-2 knockout mice. Presented at Int. Conf. Endothelins, 5th, Kyoto, Japan.

Bény J.L. (1999). Information networks in the arterial wall. *NIPS*. **14**: 68-73.

Berridge M.J. (1995). Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays*. **17**: 491-500.

Berthiaume N., Yanagisawa M., Labonte J., et D'Orleans-Juste P. (2000). Heterozygous knock-Out of ET(B) receptors induces BQ-123-sensitive hypertension in the mouse. *Hypertension*. **36**: 1002-7.

Bhattacharya M., Peri K., Ribeiro-da-Silva A., Almazan G., Shichi H., Hou X., Varma D.R., et Chemtob S. (1999). Localisation of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **274**: 15719-24.

Bhowmick N., Narayan P., et Puett D. (1998). The endothelin subtype A receptor undergoes agonist- and antagonist-mediated internalization in the absence of signaling. *Endocrinology*. **139**(7): 3185-92.

Bialecki R.A., Fisher C.S., Murdoch W.W., Barthlow H.G., et Bertelsen D.L. (1997). Functional comparison of endothelin receptors in human and rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J. Physiol.* **272**: L211-L218.

Bigaud M., et Pelton J.T. (1992). Discrimination between ETA- and ETB-receptor-mediated effects of endothelin-1 and [Ala1,3,11,15]endothelin-1 by BQ-123 in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **107**: 912-918.

Birch K.A., Pober J.S., Zavoico G.B., Means A.R., et Ewenstein B.M. (1992). Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **118**: 1501-10.

Bkaily G. (1991). Receptor and second messenger modulation of Ca^{2+} and K^{+} channels activity in vascular smooth muscle cells. In: *Ion channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells*. Eds. N. Sperelakis and H. Kuriyama. NewYork: Elsevier pp: 185-198.

Bkaily G., Economos D.L., Potvin J.L., Ardilouze C., Marriott J., Corcos D., Bonneau C. et Fong N. (1992). Blockade of insulin sensitive steady-state R-type Ca^{2+} channel by PN 200-110 in heart and vascular smooth muscle. *Mol. Cell. Biochem.* **177**: 93-106.

Bkaily G., D'Orléans-Juste P., Naik R., Pérodin J., Stankova J., Abdulnour E., et Rola-Pleszczynsky M. (1993). PAF activation of a voltage-gated R-type Ca^{2+} channel in human and canine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **110**: 519-520.

Bkaily G. (ed) (1994). Biophysical and pharmacological properties of T-, L- and R-type Ca^{2+} channels. In: *Ionic Channels in Vascular Smooth Muscle*. R.G. Landes Company, Austin, pp: 9-21.

Bkaily G. (ed) (1994a). Regulation of R-type Ca^{2+} channels by insulin and ET-1 in VSM. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol. Biol. Intelligence Unit, Austin, pp 41-52.

Bkaily G. (ed) (1994b). Regulation of Ca^{2+} channels in VSM by monocyte-released factors. In : *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol. Biol. Intelligence Unit, Austin, pp 53-64.

Bkaily G. (ed) (1994c). The possible role of Ca^{2+} and K^{+} channels in vascular smooth muscle pathophysiology. In : *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 103-113.

Bkaily G., Naik R., D'Orléans-Juste P., Wang L., et Fong C.N. (1995). Endothelin-1 activates the R-type Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* **26**: 303-306.

Bkaily G., Gros-Louis N., Naik R., Jaalouk D. et Pothier P. (1996a). Implication of the nucleus in excitation-contraction coupling of heart cells. *Mol. Cell Biochem.* **154**: 113-21.

Bkaily G., Haddad G., Gros-Louis N., Jaalouk D., Taoudi-Benchekroun M., Naik R., Pothier P., D'Orléans-Juste P., Bui M., Wang S., et Sperelakis N. (1996). Modulation of Ca^{2+} and Na^{+} transport by taurine in heart and vascular smooth muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* **403**: 263-273.

Bkaily G., Pothier P., D'Orléans-Juste P., Simaan M., Jacques D., Jaalouk D., Belzile F., Boutin C., Haddad G., et Neugebauer W. (1997a). The use of confocal microscopy in the investigation of cell structure and function in heart, vascular endothelium and smooth muscle cells. *Mol. Cell Biochem.* **172** : 171-94.

Bkaily G., D'Orléans-Juste P., Pothier P., Calixto J. B., et Yunes R. (1997b). Nuclear membrane receptors and channels : Potential therapeutical targets for drug action. *Drug Dev. Res.* **42** : 211-222.

Bkaily G., Naik R., Jaalouk D., Jacques D., Economos D., D'Orleans-Juste P., et Pothier P. (1998). Endothelin-1 and insulin activate the steady-state voltage dependent R-type Ca^{2+} channel in aortic smooth muscle cells via a pertussis toxin and cholera toxin sensitive G-protein. *Mol. Cell. Biochem.* **183 (1-2)** : 39-47.

Bkaily G., Jacques D. et Pothier P. (1999). Use of confocal microscopy to investigate cell structure and function. *Methods in Enzymology.* **307**: 119-35.

Bkaily G., Choufani S., Hassan G., El-Bizri N., et D'Orleans-Juste P. (2000). Presence of functional ET-1 receptors in the nuclear membrane of human vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: S414-S417.

Bkaily G., Massaad D., Choufani S., Jacques D. et D'Orleans-Juste P. (2002). Role of endothelin-1 receptors in the sarcolemma membrane and the nuclear membrane in the modulation of basal cytosolic and nuclear calcium levels in heart cells. *Clin. Sci.* **103**: 141S-147S.

- Bkaily G., Choufani S., Sader S., Jacques D., D'Orléans-Juste P., Nader M., Kurban G., et Kamal M. (2003). Activation of sarcolemma and nuclear membranes ET-1 receptors regulates transcellular calcium levels in heart and vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:654-662.
- Bkaily G., Jacques D., D'Orléans-Juste P., Gobeil F Jr., Chemtob S., Choufani S. et Nader M. (2003a). Nuclear membranes channels, exchangers and G-protein coupled receptors: a new target for drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* (sous presse).
- Boivin B., Chevalier D., Villeneuve LR., Rousseau E., et Allen B.G. (2003). Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **278** (31): 29153-63.
- Bolton T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* **59**: 606-718.
- Booz G.W., Conrad K.M., Hess A.L., Singer H.A., et Baker K.M. (1992). Angiotensin -II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* **130**: 3641-9.
- Booz GW. et Baker KM. (1996). Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. **28**: 635-40.
- Boulanger C., Luscher T.F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J.Clin. Invest.* **85**: 587-90.
- Bregoli L., Baldassare J.J, Raben D.M. (2001). Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to alpha-thrombin. *J. Biol. Chem.* **276** (26): 23288-95.
- Breuiller-Fouche M., heluy V., Fournier T., Dallot E., Vacher-Lavenu M.C., et Ferre F. (1998). Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured human uterine smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* **4**: 33-9.
- Brismar H., Asghar M., Carey RM., Greengard P. et Aperia A. (1998). Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5573-8.
- Brutsaert D.L., Meulemans A.L., Sipido K. R., et Sys S.U. (1987). The endocardium modulates the performance of myocardium. *Physiol. Arch. Int. Physiol. Biochem.* **95**: 4.
- Brutsaert D.L., Meulemans A.L., Sipido K.R., et Sys S.U. (1988). Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle. *Circ. Res.* **62**: 358-366.
- Brutsaert D.L. (1989). The endocardium. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 263-273.

- Brutsaert D.L., et Andries L.J. (1992). The endocardial endothelium. *Am.J.Physiol.* **263**: H985-1002.
- Brutsaert D.L., De Keulenaer G.W., Fransen P., Mohan P., Kaluza G.L., Andries L.J., Rouleau J.L., et Sys S.U. (1996). The cardiac endothelium: functional morphology, development, and physiology. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**: 239-62.
- Brutsaert D.L., Fransen P., Andries L.J., De Keulenaer G.W., et Sys S.U. (1998). Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovasc. Res.* **38**: 281-290.
- Brutsaert D.L. (2003). Cardiac Endothelial-Myocardial signalling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity. *Physiol. Rev.* **83**: 59-115.
- Busse R., Luckhoff A., et Mulisch A. (1991). Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic Res. Cardiol.* **86**: 7-16.
- Carpenter G., et Zendejui J.G. (1986). Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp. Cell Res.* **164** (1): 1-10.
- Carpentier J.L., Rees A.R., Gregoriou M., Kris R., Schlessinger J., et Orci L. (1986). Subcellular distribution of the external and internal domains of the EGF receptor in A-431 cells. *Exp. Cell. Res.* **166**(2): 312-26.
- Carter T.D. et Pearson J.D. (1992). Regulation of prostacyclin synthesis in endothelial Cells. *News. Physiol. Sci.* **7**: 64-69.
- Cattaruzza M., Dimigen C., Ehrenreich H., et Hecker M. (2000). Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB Journal.* **14**: 991-8.
- Catterall W.A. et Striessnig J. (1992). Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 256-62.
- Chao T.S., Byron K.L., Lee K.M., Villereal M., et Rosner M.R. (1992). Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **267**:19876-83.
- Choufani S. (2002). L'endothéline-1 module le calcium cytosolique et nucléaire ainsi que la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules du muscle lisse aortique humaine. *Université de Sherbrooke*.
- Clark J.D., Schievella A.R., Nalefski E.A., et Lin L.L. (1995). Cytosolic phospholipase A_2 . *J. Lipid. Media. Cell Signal.* **12**: 83-117.

Clozel M., et Gray G.A. (1995). Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: 262-4.

Cornwell T.L., et Lincoln T.M. (1989). Regulation of intracellular Ca^{2+} levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of Ca^{2+} by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* **264**(2): 1146-55.

Cristol J.P., Warner T.D., Thiernemann C., et Vane J.R. (1993). Mediation via different receptors of the vasoconstrictor effects of endothelins and sarafotoxins in the systemic circulation and renal vasculature of the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **108**: 776-779.

D'orléans-Juste P., Gratton J.P., Bkaily G. et Claing A. (1996). L'endothéline : de la pharmacologie moléculaire à ses implications en physiopathologie. *Med. Sci.* **12** : 563-574.

Das U.N., Lee A.M. et Barritt G.J. (1983). Prostanoids can modify response to electrical stimulus and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ exchange in isolated myocardial muscle cells. *Prostaglandins Leukot. Med.* **12**: 305-14.

De Nucci G., Thomas R., D'Orleans-Juste P., Antunes E., Walder C., Warner T.D., et Vane JR. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85** (24): 9797-800.

Dejana E., et Del Maschio A. (1995). Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb. Haemostasis* **74**: 309-312.

Denault J.B., Claing A., D'Orleans-Juste P., Sawamura T., Kido T., Masaki T., et Leduc R. (1995). Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.* **362**(3): 276-80.

Deschênes C., Vezina A., Beaulieu J.F., et Rivard N. (2001). Role of $\text{p}27^{\text{Kip1}}$ in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology*. **120**: 423-438.

Dipolo R.J. (1979). Calcium influx in internally dialysed squid axons. *J. Gen. Physiol.* **73**: 91-113.

Dollinger S.J., et Wahler G.M. (1994). A nitric oxide donor has stimulatory and inhibitory effects on the cardiac calcium current, both of which are inhibited by a G-kinase blocker. *Biophys. J.* **66**: A238.

D'Orléans-Juste P., Labonte J., Bkaily G., Choufani S., Plante M., et Honore J.C. (2002). Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Ther.* **95**(3):221-38.

Douglas S.A. et Ohlstein E.H. (1997). Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J. Vasc. Res.* **34**: 152-64.

Douglas S.A., Beck G.R., Elliott J.D., et Ohlstein E.H. (1995). Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.* **114**: 1529-1540.

Dupuis J., Goresky C.A., et Fournier A. (1996). Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J. Appl. Physiol.* **8**: 1510-5.

Ebihara Y., Haist J., et Karmazyn M. (1996). Modulation of endothelin effects on rat hearts and cardiomyocytes by nitric oxide and 8-bromo cyclic GMP. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**: 265-277.

Echevarria W., Leite M.F., Guerra M.T., Zipfel W.R., et Nathanson M.H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol.* **5**(5):440-6.

Elliott J.D., Lago M.A., Cousins R.D., Gao A., Leber J.D., Erhard K.F., Nambi P., Elshourbagy N.A., Kumar C., Lee J.A., Bean J.W., DeBrosse C.W., Eggleston D.S., Brooks D.P., Feuerstein G., Ruffolo R.R., Weinstock J., Gleason J.G., Peishoff C.E., et Ohlstein E.H. (1994). 1,3-Diarylindan-2-carboxylic acids, potent and selective non-peptide endothelin receptor antagonists. *J Med Chem.* **27**;37(11):1553-7.

Emori T., Hirata Y., Ohta K., Kanno K., Eguchi S., Imai T., Shichiri M., Marumo F. (1991). Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension.* **18**(2): 165-70.

Emori T., Hirata Y., Imai T., Ohta K., Kanno K., Eguchi S., et Marumo F. (1992). Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol.* **44**(12): 2409-11.

Feron O., Smith T.W., Michel T., et Kelly R.A. (1997). Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 17744-8.

Fisher T.E., et Bourque C.W. (2001). The function of Ca(2+) channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **77**: 269-303.

Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M., et Breitman M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**(6535): 66-70.

Fox A.P., Nowycky M.C., et Tsien R.W. (1987). Single-channel recording of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J. Physiol.* **394**: 173-200.

Frank H.J, Levin E.R., Hu R.M., et Pedram A. (1993). Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **133**: 1092-97.

Frearson J.A., Harrison P., Scrutton M.C. et Pearson J.D. (1995). Differential regulation of von Willebrand factor exocytosis and prostacyclin synthesis in electroporabilized endothelial cell monolayers. *Biochem. J.* **309**: 473-9.

Fujita Y., Mynlieff M., Dirksen R.T., Kim M.S., Niidome T., Nakai J., Friedrich T., Iwabe N., Miyata T., et Furuichi T. (1993). Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron.* **10**: 585-98.

Fukuroda T., Fujikawa T., Ozaki S., Ishikawa K., Yano M., et Nishikibe M. (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 1461-5.

Furchgott R.F, et Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.

Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V. et Petersen O.H. (1996). Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Archiv.* **432**: 1-6.

Giannessi D., Del Ry S., et Vitale R.L. (2001). The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol. Res.* **43(2)**: 111-26.

Gobeil F J.r, Dumont I., Marrache A.M, Vazquez-Tello A., Bernier S.G, Abran D., Hou X., Beauchamp M.H., Quiniou C., Bouayad A., Choufani S., Bhattacharya M., Molotchnikoff S., Ribeiro-Da-Silva A., Varma D.R., Bkaily G., et Chemtob S. (2002). Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ. Res.* **90(6)**: 682-9.

Goraca A.(2002). New views on the role of endothelin. *Endocr. Regul.* **36(4)**: 161-7.

Gotlieb A.I., Langille L., Wong M.K.K., et Kim D.W. (1991). Biology of disease. Structure and function of endothelial cytoskeleton. *Lab. Invest.* **65**: 123-137.

Goto K., Hiroshi H., et Kasuya Y. (1996). Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn. J. Pharmacol.* **72**: 261-290.

Graier W.F., Groschner K., Schmidt K. et Kukovetz W.R. (1992). SK&F 96365 inhibits histamine-induced formation of endothelium-derived relaxing factor in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 1539-45.

Gray G.A., et Webb D. (1996). The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol.* **72**: 109-148.

Griendling K.K., Tsuda T., et Alexander R.W. (1989). Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 8237-40.

Gryniewicz G., Poenie M., et Tsien R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**(6): 3440-50.

Guarda E., Katwa L.C., Myers P.R., Tyagi S.C., et Weber K.T. (1993). Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **27**: 2130-4.

Gutkind J.S. (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **273**(4): 1839-42.

Haegerstrand A., Hemsén A., Gillis C., Larsson O., et Lundberg J.M. (1989). Endothelin: presence in human umbilical vessels, high levels in fetal blood and potent constrictor effect. *Acta. Physiol. Scand.* **137**(4): 541-2.

Hassan G.S. (2001). Présence des jonctions de type gap dans les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vasculaire humaines et leur contribution à la modulation du calcium intracellulaire. *Université de Sherbrooke*.

He J.Q., Pi Y., Walker J.W., et Kamp T.J. (2000). Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type Ca^{2+} current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* **524**: 807-20.

Hillman D., Chen S., Aung T.T., Cherksey B., Sugimori M., et Llinas R.R. (1991). Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 7076-80.

Hirata Y., Emori T., Eguchi S., Kanno K., Imai T., Ohta K., et Marumo F. (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **91**: 1367-1373.

Hori S., Komatsu Y., Shigemoto R., Mizuno N., et Nakanishi S. (1992). Distinct tissue distribution and cellular localisation of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* **130**: 1885-1895.

Horvat A. (1978). Insulin binding sites on rat liver nuclear membranes: biochemical and immunofluorescent studies. *J. Cell Physiol.* **97**(1): 37-47.

- Hocher B., Ruben C., Hensen J., Gross P., et Bauer C. (1992). Intracellular distribution of endothelin-1 receptor in rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 498-503.
- Hosey M.M., et Lazdunski M. (1988). Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membr. Biol.* **104**: 81-105.
- Hosoda K., Nakao K., Arai H., Suga S., Ogawa Y., Mukoyama M., Shirakami G., Saito Y., Nakanishi S., et Imura H. (1991). Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.* **287**: 23-6.
- Hunley T.E., et Kon V. (2001). Update on endothelins - biology and clinical implications. *Pediatr. nephrol.* **16(9)**:752-62.
- Iborra F.J., Jackson D.A., et Cook P.R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* **293**: 1139-42.
- Ihara M., Saeki T., Fukuroda T., Kimura S., Ozaki S., Patel AC., et Yano M. (1992). A novel radioligand [¹²⁵I]BQ-3020 selective for endothelin (ETB) receptors. *Life Sci.* **51(6)**: PL47-52.
- Inagami T., Naruse M. et Hoover R. (1995). Endothelium as an endocrine organ. *Ann. Rev. Physiol.* **57**: 171-89.
- Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T., Goto K., et Masaki T., (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2863-7.
- Iouzalet L., Lantoine F., Pernollet M.G., Millanvoe-Van Brussel E., Devynck M.A., et David-Dufilho M. (1996). SK&F 96365 inhibits intracellular Ca²⁺ pumps and raises cytosolic Ca²⁺ concentration without production of nitric oxide and von Willebrand factor. *Cell Calcium.* **20**: 501-8.
- Ishikawa K., Ihara M., Noguchi K., Mase T., Mino N., Saeki T., Fukuroda T., Fukami T., Ozaki S., Nagase T., Nishikibe M. et Yano M. (1994). Biochemical and Pharmacological Profile of a Potent and Selective Endothelin B-Receptor Antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **24**; **91 (11)**: 4892-4896.
- Itoh Y., Yanagisawa M., Ohkubo S., Kimura C., Kosaka T., Inoue A., Ishida N., Mitsui Y., Onda H., Fujino M., et al. (1988). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett.* **231(2)**: 440-4.
- Iwasaki H., Eguchi S., Ueno H., Marumo F., et Hirata Y. (1999). Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase

cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology*. **140** (10): 4659-68.

Jacques D., Sader S., Choufani S., D'Orleans-Juste P. et Charest D. (2000). Endothelin-1 regulates cytosolic and nuclear Ca^{2+} in human endocardial endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: S397-S400.

Jacques D., Sader S., Perreault C., Fournier A., Pelletier G., Beck-Sickinger A.G., et Descorbeth M. (2003). Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81** (3): 288-300.

Jun K., Piedras-Renteria E.S., Smith S.M., Wheeler D.B., Lee S.B., Lee T.G., Chin H., Adams M.E., Scheller R.H., Tsien R.W., Shin H.S. (1999). Ablation of P/Q-type $\text{Ca}(2+)$ channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the $\alpha(1A)$ -subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **21;96(26)**:15245-50.

Kanaide H. (1996). Endothelin regulation of vascular tonus. *Gen. Pharmacol.* **27** (4): 559-63.

Karne S., Jayawickreme C.K., et Lerner M.R. (1993). Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **268(25)**: 19126-33.

Katz B.(1969). The release of neuronal transmitter substances. C.C. Thomas, Ed. Liverpool University Press. Liverpool. Sherrington Lectures (10)1X:2-5.

Kedzierski R.M. et Yanagisawa M. (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 851-76.

Kim S.Z., Cho K.W. et Kim S.H. (1999). Modulation of endocardial natriuretic peptide receptors in right ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **277**: H2280-9.

Kisanuki Y., Ohuchi Y., Takahashi H., Hammer R.E., Williams S.C., et al. (1999). Endothelial cell-specific knock-out of the endothelin-1 gene in mice. Presented at Int. Conf. Endothelins, 6th, Montreal, Canada.

Kohno M., Horio T., Ikeda M., Yokokawa K., Fukui T., Yasunari K., Kurihara N., et Takeda T. (1992). Angiotensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* **42(4)**: 860-6.

Kohno M., Horio T., Yokokawa K., Kurihara N., et Takeda T. (1992b). C-type natriuretic peptide inhibits thrombin- and angiotensin II-stimulated endothelin release via cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Hypertension*. **19(4)**: 320-5.

Kohno M., Yokokawa K., Horio T., Ikeda M., Kurihara N., Mandal A.K., et Takeda T. (1994). Heparin inhibits endothelin-1 production in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* **45**(1): 137-42.

Korth P., Bohle R.M., Corvol P., et Pinet F. (1999). Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **47**(4): 447-62.

Kuchan M.J., et Frangos J.A. (1993). Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **264**(1 Pt 2): H150-6.

Kurihara Y., Kurihara H., Oda H., Maemura K., Nagai R., Ishikawa T., et Yazaki Y. (1995). Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J. Clin. Invest.* **96**(1): 293-300.

Kurihara Y., Kurihara H., Suzuki H., Kodama T., Maemura K., Nagai R., Oda H., Kuwaki T., Cao W.H., Kamada N., et al. (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature.* **368**(6473): 703-10.

Lantoine F., Iouzalet L., Devynck M.A., Millanvoeye-Van Brussel E. et David-Duflilio M. (1998). Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* **330**: 695-9.

Leach K.L. et Raben D.M. (1993). Nuclear localization of protein kinase C. *Biochem. Soc. Transact.* **21**: 879-83.

Lee M.E., De La Monte S.M., Ng S.C., Bloch K.D., et Quertermous T. (1990). Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in human central nervous system. *J. Clin. Invest.* **86**: 141-47.

Levin E.R. (1995). Mechanisms of disease: Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **333**(6): 356-363.

Liao W., Bisgrove B.W., Sawyer H., Hug B., Bell B., Peters K., Grunwald D.J., et Stainier D.Y. (1997). The zebrafish gene *cloche* acts upstream of a *flk-1* homologue to regulate endothelial cell differentiation. *Development* **124**: 381-389.

Lin H.Y., Kaji E.H., Winkel G.K., Ives H.E., et Lodish H.F. (1991). Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**(8): 3185-9.

Lind G.J., et Cavanagh H.D. (1993). Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**(10): 2943-52.

Lindpaintner K., et Ganten D. (1991). Tissue renin-angiotensin systems and their modulation: the heart as a paradigm for new aspects of converting enzyme inhibition. *Cardiology*. **79 Suppl 1**:32-44.

Llinas R.R., Sugimori M. et Cherksey B. (1989). Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **560**: 103-11.

Lu D., Yang H., Shaw G., et Raizada M.K. (1998). Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology* **139**: 365-75.

Lum H., et Malik A.B. (1996). Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**: 787-800.

Malek A.M., Greene A.L., et Izumo S. (1993). Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90(13)**: 5999-6003.

Mallat A., Fouassier L., Preaux A.M., Gal C.S., Raufaste D., Rosenbaum J., Dhumeaux D., Jouneaux C., Mavrier P., et Lotersztajn S. (1995). Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J. Clin. Invest.* **96**: 42-9.

Marks A.R. (1992). Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation*. **86**: 61-67.

Marrache AM., Gobeil F Jr., Bernier SG., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Choufani S., Bkaily G., Bourdeau A., Sirois MG., Vazquez-Tello A., Fan L., Joyal JS., Filep JG., Varma DR., Ribeiro-Da-Silva A. et Chemtob S. (2002). Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J. Immunol.* **169**: 6474-81.

Marsault R., Feolde E., et Frelin C. (1993). Receptor externalization determines sustained contractile responses to endothelin-1 in the rat aorta. *Amer. J. Physiol.* **264**: 687-93.

Marti U., Ruchti C., Kampf J., Thomas G.A., Williams E.D., Peter H.J., Gerber H., Burgi U. (2001). Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid*. **11(2)** : 137-45.

Masaki T. (1998). Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 235-255.

Masaki T., Vane J.R., et Vanhoutte P.M. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol. Rev.* **46**: 137-142.

- Massfelder T., Dann P., Wu T.L., Vasavada R., Helwig J.J. et Stewart A.F. (1997). Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 13630-5.
- Matsumoto H., Suzuki N., Onda H., et Fujino M. (1989). Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 74-80.
- Mebazaa A., Martin LD, Robotham JL, Maeda K, Gabrielson EW, et Wetzel RC. (1993). Right and left ventricular cultured endocardial endothelium produces prostacyclin and PGE₂. *J. Mol. Cell Cardiol.* **25** (3): 245-8.
- Mebazaa A., Mayoux E., Maeda K., Martin L.D., Lakatta E.G., Robotham J.L., et Shah A.M. (1993a). Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am. J. Physiol.* **265** (5 Pt 2): H1841-6.
- Mebazaa A., Wetzel R., Cherian M., et Abraham M. (1995). Comparison between endocardial and great vessel endothelial cells: morphology, growth, and prostaglandin release. *Am. J. Physiol.* **268** (1 Pt 2): H250-9.
- Michel T. et Feron O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* **100**: 2146-52.
- Michel J.B., Feron O., Sase K., Prabhakar P. et Michel T. (1997). Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **272**: 25907-12.
- Miller R.C., Pelton J.T., Huggins J.P. (1993). Endothelins--from receptors to medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* **14** (2): 54-60.
- Mintz I.M., Sabatini B.L. et Regehr W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron.* **15**: 675-88.
- Miquerol L., Gertsenstein M., Harpal K., Rossant J., et Nagy A. (1999). Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev. Biol.* **212**: 307-322.
- Mitra R. et Morad M. (1986). Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 5340-4.
- Molenaar P., O'Reilly G., Sharkey A., Kuc R.E., Harding D.P., Plumpton C., Gresham G.A., et Davenport A.P. (1993). Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ. Res.* **72**(3): 526-38.

Nambi P., Kumar C., et Ohlstein E.H. (1995). Signal transduction processes involved in endothelin-mediated responses. In: *Endothelin receptors*.

Namiki A., Hirata Y., Ishikawa M., Moroi M., Aikawa J., Machii K. (1992). Endothelin-1- and endothelin-3-induced vasorelaxation via common generation of endothelium-derived nitric oxide. *Life Sci.* **50** (10): 677-82.

Naomi S., Iwaoka T., Disashi T., Inoue J., Kanesaka Y., Tokunaga H., et Tomita K. (1998). Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation.* **97**: 234-236.

Niggli E. et Lederer W.J. (1991). Real-time confocal microscopy and calcium measurements in heart muscle cells: towards the development of a fluorescence microscope with high temporal and spatial resolution. *Cell Calcium.* **11**: 121-30.

Niggli E., Piston D.W., Kirby M.S, Cheng H., Sandison D.R., Webb W.W. et Lederer W.J. (1994). A confocal laser scanning microscope designed for indicators with ultraviolet excitation wavelengths. *Am. J. Physiol.* **266**: 303-10.

Nilius B. et Riemann D. (1990). Ion channels in human endothelial cells. *Gen. Physiol. Biophys.* **9**: 89-111.

Nilius B., et Cateels R. (1994). Biology of the vascular wall and its interaction with migratory and blood cells. In: *Comprehensive Human Physiology*, edited by Greger, R. and Windhorst, U. Berlin: Springer-Verlag, p. 1981-1994.

Nilius B., et Droogmans G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**: 1415-59.

Nilius B., Viana F. et Droogmans G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Ann. Rev. Physiol.* **59**: 145-70.

Nosaka S., Hashimoto M., Sasaki T., Ku K., Saitoh Y., Yamauchi M., Tanabe Y., Nakaki T., Hishikawa K., Masumura S., Nakayama K. et Tamura K. (1997). The effects of transmural pressure on prostacyclin release from porcine endocardial endothelial cells--comparison with vascular endothelial cells. *Pflugers Archiv.* **433**: 848-50.

Nowycky M.C., Fox A.P. et Tsien R.W. (1985). Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 2178-82.

Ogawa Y., Nakao K., Arai H., Nakagawa O., Hosoda K., Suga S.M., Nakanisshi S., et Imura H. (1991). Molecular cloning of non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 248-255.

- Oldroyd S.D., et Morcos S.K. (2000). Endothelin: what does the radiologist need to know? *B.r J. Radiol.* **73**(876): 1246-51.
- Opgenorth T.J., Wessale J.L., Dixon D.B., Adler A.L., Calzadilla S.V., Padley R.J., et Wu-Wong J.R. (2000). Effects of endothelin receptor antagonists on the plasma immunoreactive endothelin-1 level. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: 292-6.
- Ozaki S., Ohwaki K., Ihara M., et Fukuroda T., Ishikawa K., et Yano M. (1995) ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 483-489.
- Pang D.C., Johns A., Patterson K., Botelho L.H., et Rubanyi G.M. (1989). Endothelin-1 stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and calcium uptake in isolated canine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**: 75-9.
- Parton R.G. (1996). Caveolae and caveolins. *Curr. Op. Cell Biol.* **8**: 542-8.
- Patel T.R., Galbraith S.L., McAuley M.A., Doherty A.M., Graham D.I., et McCulloch J.(1995). Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in experimental stroke. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**: S412-5.
- Patel V., Brown C., Goodwin A., Wilkie N., et Boarder M.R. (1996). Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production. *Biochem. J.* **320**: 221-6.
- Paul M., Bachmann J. et Ganten D. (1992). The tissue renin-angiotensins systems in vascular disease. *Trends Cardiovasc .Med.* **2**: 94-99.
- Payraastre B., Nievers M., Boonstra J., Breton M., Verkleij AJ. et Van Bergen en Henegouwen P.M. (1992). A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **267**: 5078-84.
- Pollock D.M., Keith T.L., et Highsmith R.F. (1995). Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.* **9**: 1196-1204.
- Prabhakar P., Thatte H.S., Goetz R.M., Cho M.R., Golan D.E. et Michel T. (1998). Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 27383-8.
- Prins B.A, Hu R.M, Nazario B., Pedram A., Frank H.J., Weber M.A., et Levin E.R. (1994). Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**(16): 11938-44.

- Puri M.C., Partanen J., Rossant J., et Bernstein A. (1999). Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development* **126**: 4569-4580.
- Qian J., Colmers W.F., et Saggau P. (1997). Inhibition of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat hippocampal area CA1: modulation of presynaptic Ca^{2+} entry. *J. Neurosci.* **17**: 8169-77.
- Redmond E.M., Cahill P.A., Hodges R., Zhang S., et Sitzmann J.V. (1996). Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **166**: 469-79.
- Regan L.J., Sah D.W. et Bean B.P. (1991). Ca^{2+} channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron.* **6**: 269-80.
- Regehr W.G. et Mintz I.M. (1994). Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses. *Neuron.* **12**: 605-13.
- Rettig J., et Neher E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{++} -triggered exocytosis. *Science.* **298(5594)**:781-5.
- Rhodin J.A.G. (1974). Histology. A Text and Atlas. New York : Oxford University Press. p. 803.
- Rotrosen D. et Gallin J.I. (1986). Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J. Cell Biol.* **103**: 2379-87.
- Rubanyi G., et Polokoff M. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**: 325-415.
- Sader S. (2002). Évolution de l'expression du NPY et de ses récepteurs dans l'endothélium endocardique au cours du développement fœtal chez l'humain; rôle du NPY dans l'homéostasie calcique intracellulaire. *Université de Sherbrooke*.
- Saetrum Opgaard O., Adner M., Peters T.H., Xu C.B., Stavenow L., Gulbenkian S., Erlinge D., Edvinsson L., et Sharma H.S. (2001). Endocardial expression and functional characterization of endothelin-1. *Mol. Cell Biochem.* **224(1-2)**: 151-8.
- Sakai S., Miyauchi T., Kobayashi M., Yamaguchi I., Goto K., et Sugishita Y. (1996). Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* **384**: 353-55.

- Sakamoto A., Yanagisawa M., Sakurai T., Takuwa Y., Yanagisawa H., et Mazaki T. (1991). Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 656-663.
- Sakurai T., Yanagisawa M., Inoue A., Ryan U.S., Kimura S., Mitsui I., Goto K., et Masaki T. (1991). cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**: 44-7.
- Sakurai T., Yanagisawa M., Takuwa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K., et Masaki T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348(6303)**: 732-5.
- Sato T.N., Tozawa Y., Deutsch U., Wolburg B.K., Fujiwara Y., Gendron M.M., Gridley T., Wolburg H., Risau W., et Qin Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**: 70-74.
- Sawamura T., Kimura S., Shinmi O., Sugita Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yanagisawa M., Goto K., et Masaki T. (1990). Characterization of endothelin converting enzyme activities in soluble fraction of bovine cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29;169(3)**: 1138-44.
- Schulz R., Smith J.A., Lewis M.J., et Moncada S.(1991). Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br. J. Pharmacol.* **104(1)**: 21-4.
- Schwartz T.W., Fuhlendorff J., Kjems L.L., Kristensen M.S., Vervelde M., O'hare M., Krstenansky J.L. et Bjornholm B. (1990). Signal epitopes in the three-dimensional structure of neuropeptide Y. Interaction with Y1, Y2, and pancreatic polypeptide receptors. *Ann. NY. Acad. Sci.* **611**: 35-47.
- Shah A.M. (1996). Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc Res.* **31(6)**: 847-67.
- Shah A.M., Grocott-Mason R.M., Pepper C.B., Mebazaa A., Henderson A.H., Lewis M.J., et Paulus W.J. (1996). The cardiac endothelium: cardioactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39(3)**: 263-84.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L., et Schuh A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**: 62-66.
- Shichiri M., Kato M., Marumo F., et Hirata Y. (1997) Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension.* **30**: 1198-1203.
- Simonson M.S. (1993). Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.* **73**: 375-411.

Smith P.J., Teichert-Kuliszewska K., Monge J.C., et Stewart D.J. (1998). Regulation of endothelin-B receptor mRNA expression in human endothelial cells by cytokines and growth factors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**(Suppl. 1): S158-60.

Sokolovsky M. (1995). Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **68**: 435-71.

Spedding M., et Paoletti R. (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.* **44**: 363-76.

Spencer A.G., Woods J.W., Arakawa T., Singer I.I. et Smith W.L. (1998). Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* **273**: 9886-93.

Sporn L., Marder V.J. et Wagner D.D. (1989). The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. *J. Cell Biol.* **38**: 99-114.

Stein P.D, Hunt J.T, Floyd D.M., Moreland S., Dickinson K.E., Mitchell C., Liu E.C., Webb M.L, Murugesan N., Dickey J., Mc Mullen D., Zhang R., Lee V.G., Serafino R., Delaney C., Schaeffer T.R., et Kozlowski M. (1994). The discovery of sulfonamide endothelin antagonists and the development of the orally active ETA antagonist 5-(dimethylamino)-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1-naphthalenesulfonamide. *J Med Chem.* **4**;37(3):329-31.

Sudjarwo S.A., Hori M., Takai M., Urade Y., Okada T., et Karaki, H. (1993). A novel subtype of endothelin B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. *Life Sci.* **53**: 431-7.

Sugishita Y., Takahashi T., Shimizu T., Yao A., Kinugawa K.I., Sugishita K., Harada K., Matsui H., et Nagai R. (2000). Expression of genes encoding vascular endothelial growth factor and its Flk-1 receptor in the chick embryonic heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**: 1039-1051.

Suri C., Jones P.F., Patan S., Bartunkova S., Maisonnier P.C., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D.(1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* **87**: 1171-80.

Takahashi T., et Momiyama A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature.* **366**: 156-8.

Takai M., Umemura I., Yamasaki K., Watakabe T., Fujitani Y., Oda K., Urade Y., Inui T., Yamamura T., et Okada T. (1992). A potent and specific agonist, Suc-[Glu9,Ala11,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ETB receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184** (2): 953-9.

- Takeda K., et Klepper M. (1990). Voltage-dependent and agonist-activated ionic currents in vascular endothelial cells: a review. *Blood Vessels*. **27**: 169-183.
- Takeda K., Schini V. et Stoeckel H. (1987). Voltage-activated potassium, but not calcium currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch*. **410**: 385-393.
- Takigawa M., Sakurai T., Kasuya Y., Abe Y., Masaki T., et Goto K. (1995). Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur. J. Biochem*. **228**: 102-108.
- Taoudi-Benchekroun M., Gros-Louis N., Bkaily G. et D'Orléans-Juste P. (1995). R-type calcium channel involved in endothelin-1 induced contraction of newborn rabbit aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. **26**: S300-2.
- Triggle D.J. (1999). The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca^{2+} channels. *Eur. J. Pharmacol*. **375**: 311-25.
- Tsien R.W. (1989). Fluorescent indicators of ion concentrations. In "*Methods in Cell Biology*". Eds D.L. Taylor and Y.L. Wang. Academic Press, 30 (B): 127-156.
- Tsien RW., Lipscombe D., Madison DV., Bley KR. et Fox AP. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci*. **11**: 431-8.
- Ventura C., Maioli M., Pintus G., Posadino AM. et Tadolini B. (1998). Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei. *J. Biol. Chem*. **273**: 13383-6.
- Ventura C., Zinellu E., Maninchedda E., Fadda M. et Maioli M. (2003). Protein kinase C signaling transduces endorphin-primed cardiogenesis in GTR1 embryonic stem cells. *Circ. Res*. **92**: 617-22.
- Vigneri R., Goldfine I.D., Wong K.Y., Smith G.J. et Pezzino V. (1978) The nuclear envelope. The major site of insulin binding in rat liver nuclei. *J. Biol. Chem*. **253**(7): 2098-103.
- Wang J., et Morgan JP. (1992). Endocardial endothelium modulates myofilament Ca^{2+} responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circ. Res*. **70**(4): 754-60.
- Warner T.D., Mitchell J.A., De Nucci G., et Vane J.R. (1989) Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. **13**: S85-S88.
- Watson S., et Arkinstall S.: *ENDOTHELIN*. In: *The G-Protein Linked Receptor*. S Watson, S Arkinstall (eds). Academic Press, London, 1994, pp 111-116

Webb D.J, et Strachan F.E. (1998). Clinical experience with endothelin antagonists. *Am. J. Hypertens.* **11(4 Pt 3)**: 71S-79S.

Wendel-Wellner M., Noll T., Konig P., Schmeck J., Koch T., et Kummer W. (2002). Cellular localization of the endothelin receptor subtypes ET(A) and ET(B) in the rat heart and their differential expression in coronary arteries, veins, and capillaries. *Histochem. Cell Biol.* **118(5)**: 361-9.

Wheeler D.B., Sather W.A., Randall A. et Tsien R.W. (1994). Distinctive properties of a neuronal calcium channel and its contribution to excitatory synaptic transmission in the central nervous system. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **29**: 155-71.

White D.G., Munding J.W., Sumner M.J., et Watts I.S. (1993). The effect of endothelins on nitric oxide and prostacyclin production from human umbilical vein, porcine aorta and bovine carotid artery endothelial cells in culture. *Br. J. Pharmacol.* **109(4)**: 1128-32.

Wickman K., et Clapham D.E. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* **75**: 865-85.

Williams M.E., Brust P.F., Feldman D.H., Patthi S., Simerson S., Maroufi A., McCue AF., Velicelebi G., Ellis S.B. et Harpold M.M. (1992). Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science.* **257**: 389-95.

Wu L.G. et Saggau P. (1994). Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J. Neurosci.* **14**: 5613-22.

Wysolmerski R.B., et Lagunoff D. (1988). Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion. *Am. J. Pathol.* **132**: 28-37.

Xie X., Wu G., Lu Z.H. et Ledeen R.W. (2002). Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *J. Neurochem.* **81**: 1185-95.

Yamada H., Fabris B., Allen A.M., Jackson B., Johnston C.I., et Mendelsohn A.O. (1991). Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. *Circ. Res.* **68 (1)**: 141-9.

Yamauchi A. (1980). Fine structure of the fish heart. In: *Hearts and heart-like organs*. New York: Academic, vol 1, p:119-143.

Yanagisawa H., Hammer R.E., Richardson J.A., Emoto N., Williams S.C., Takeda S., Clouthier D.E. et Yanagisawa M. (2000). Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a

role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J. Clin. Invest.* **105**(10): 1373-82.

Yanagisawa M. et Masaki T. (1989). Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1877-83.

Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K. et Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells. *Nature*. **332**: 411-415.

Yokokawa K., Kohno M., Mandal A.K., Tahara H., Yanagisawa M., Takeda T., et Kohne M. (1994). Heparin suppresses endothelin-1 peptide and mRNA expression in cultured endothelial cells of spontaneously hypertensive rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **4**(9): 1683-9.

York J.D., Odom A.R., Murphy R., Ives E.B. et Wente S.R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science*. **285**: 96-100.

Yoshizumi M., Kurihara H., Morita T., Yamashita T., Oh-Hashi Y., Sugiyama T., Takaku F., Yanagisawa M., Masaki T., et Yazaki Y. (1990). Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166** (1) :324-9.

Yoshizumi M., Kurihara H., Sugiyama T., Takaku F., Yanagisawa M., Masaki T. et Yazaki Y. (1989). Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**(2): 859-64.